



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

Departamento de Bioquímica

Regulación de la biología de las células
troncales y el corazón adulto por la
variante de calcineurina CnA β 1

Jesús María Gómez Salinero

Madrid, 2015

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Regulación de la biología de las células troncales y el corazón adulto por la variante de calcineurina CnA β 1

Jesús María Gómez Salinero

Licenciado en Biotecnología

Dirigida por el Dr. Enrique Lara Pezzi

Fundación Centro Nacional de Investigaciones

Cardiovasculares Carlos III (CNIC)



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



cnic

Certificado del Director:

Dr. Enrique Lara Pezzi, Jefe de Investigación de la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III.

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada ***“Regulación de la biología de las células troncales y el corazón adulto por la variante de calcineurina CnA81”*** presentada por Jesús María Gómez Salinero, ha sido realizada bajo mi tutela y dirección, autorizándose para presentación ante el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Madrid, a 26 de Octubre de 2015.

Enrique Lara Pezzi

**La presente tesis se la dedico a
Mis padres, mi hermana y mi novia.**

Observar sin pensar es tan peligroso como pensar sin observar.

Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, con su ayuda, han colaborado en la realización del presente trabajo.

Merece especial reconocimiento mi director de Tesis el Dr. **Enrique Lara Pezzi**, que me ofreció la oportunidad de trabajar en su laboratorio antes incluso de finalizar mis estudios Universitarios. Durante todos estos años no solo ha ayudado en la dirección de mi Tesis Doctoral, sino que también me ha apoyado en muchos de los experimentos que le he sugerido. Por otro lado, su supervisión del trabajo me ha ayudado a mejorarlo y a comprender mucho mejor los mecanismos moleculares que regulan la función de la calcineurina A beta 1. Debo agradecerle también la oportunidad de haber podido colaborar en diferentes líneas del laboratorio, así como su supervisión en la redacción de los proyectos y artículos.

Antes de continuar agradeciendo a todos los que han contribuido en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, me gustaría agradecer a aquellos que me ayudaron a llegar hasta aquí. Los primeros a quienes quiero agradecer su apoyo incondicional y sugerencias a lo largo de mi vida son mis padres: **Maria Ángeles y José Manuel**, muchas gracias. Sin vuestro apoyo, y sin el esfuerzo que os ha costado mi educación, no habría llegado donde estoy hoy. Recuerdo que dudé entre Medicina y Biotecnología, u otra carrera de ciencias básicas para trabajar en laboratorio. El camino no ha sido fácil, pero estoy convencido de que fue una elección acertada porque cada mañana me levanto feliz de poder trabajar en lo que más me gusta. También quiero agradecer a **mi hermana** todos los momentos alegres que me ha ofrecido a lo largo de estos años. No obstante, y aunque el apoyo de mi familia ha sido muy importante, quizás quienes hayan contribuido más en mi decisión por entrar en el laboratorio de Enrique, especializado en splicing alternativo, fueron los profesores **Javier Sierra y Javier Iturbe**, que me hablaron por primera vez de éste mecanismo y que tanto me gustó. Por último, quería agradecer a mi novia **Rocio** el haberme apoyado durante todos estos años. Estoy seguro que no ha debido ser fácil tener que

esperar porque salía tarde del trabajo, o las mil cenas en las que hablaba de los resultados con los amigos. No obstante, debo agradecer tu constante ilusión por mi trabajo, que me ha motivado a desarrollar mis ideas en algunos experimentos que posteriormente han sido muy importantes en este proyecto. Por esto, y por mil otras cosas, puedo decir que tú también formas parte de esta Tesis.

La siguiente persona a la que me gustaría agradecer esta Tesis es a mi compañera de trabajo **Marina**, que ha estado trabajando conmigo desde el primer día, y de quien he aprendido tantas cosas, aunque quizás debería darle las gracias sobre todo por haber hecho del laboratorio un lugar alegre donde siempre que estaba ella daba gusto venir a trabajar. Con el paso de los años, el laboratorio se ha llenado de muchos otros compañeros, y amigos, con quienes he disfrutado mucho trabajando, y con quienes he compartido grandes momentos. Me gustaría agradecer especialmente a **Javier** y a **Paula** el haber podido compartir poyata con ellos y por haber hecho del laboratorio un lugar más agradable. Por otro lado, quiero agradecer a Alberto su contribución en el análisis de los datos de RNAseq realizados y sus preguntas, que han contribuido a mejorar éste proyecto. Una persona del laboratorio que también ha contribuido mucho en ésta Tesis ha sido **María** que ha realizado todas las ecografías y los análisis, y me ha enseñado a analizar ecografías, y que siempre me ha estado disponible, incluso cuando la avisaba con poco tiempo. También me gustaría agradecer el tiempo que he pasado con otras personas del laboratorio y que me han enseñado diversas técnicas y siempre han estado dispuesta a ayudarme como **Laura**, o con quienes he colaborado en otros proyectos como **Enda** o **Girolamo**.

Merecen una mención especial **Giovanna y Teresa Rayón**, que junto a **Paco y Nines**, me enseñaron todo lo que saben del cultivo y diferenciación de las células embrionarias. Además, **Giovanna y Nines**, junto a la Unidad de Transgénesis se encargó de la generación de los animales knockout que se han usado en esta Tesis. También quiero agradecer el trabajo de la gente que desde las múltiples Unidades Técnicas y servicios del CNIC han contribuido a mejorar mi trabajo, especialmente a **Frank** por toda la ayuda en el animalario, a **Fernando Martinez** por las sugerencias relacionadas con los modelos estructurales y a **Elvira, Antonio y Verónica** por su ayuda con el confocal y el análi-

sis de las imágenes. Por otro lado, quiero agradecer a **Isabel Hidalgo** por ayudarme con la citometría de las HSC, y a **Vanessa Nuñez**, que me ayudó durante mucho tiempo con un proyecto de colaboración en macrófagos.

Por otro lado, ha habido muchas personas que no sólo me han ayudado con sugerencias a lo largo de todos estos años, pero que de una forma u otra me han ayudado a estar mucho más a gusto trabajando. Unas de las personas con quienes he pasado más tiempo han sido **Esther y Dorota**, con quienes he podido discutir tranquilamente de muchas cosas del trabajo, y con quienes he pasado momentos que siempre recordaré en el CNIC, y en algunos congresos como en Heidelberg o en el Weinstein. No obstante, son muchas las personas con las que he interactuado estos años, y de quienes he aprendido mucho: **Carlota, Adela, Rocio, Ana, Ileana, Sara, Carlos, Miriam, Vanesa, Piedad y Laura, Julio, Teresa, Melisa, Claudio, Sergio, Bárbara, Elisa, Toñi, Edgar, Valle, Guadalupe, Inmaculada**, muchas gracias. Otras personas cuya interacción ha sido muy importante por las sugerencias, y oportunidades que me han brindado durante este tiempo, y a quienes quiero agradecerles son: **Miguel Manzanares, Mercedes Ricote y Alicia García Arroyo**.

También quiero agradecer a mi amigo **Bernardo José Gómez**, por las discusiones científicas, que trabajando en un campo completamente diferente, en ocasiones me han dado ideas muy interesantes.

Por último, y no menos, me gustaría agradecer el apoyo de mis compañeros de Universidad con quienes he mantenido contacto y he podido discutir de diversos temas científicos que me han enriquecido.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

RESUMEN

El splicing alternativo desempeña un papel muy importante durante la diferenciación de las células progenitoras embrionarias (ESC). Nuestros resultados muestran como Mbnl1 regula el splicing del mRNA de calcineurina A beta (CnA β) en ESC de ratón, resultando en la expresión de la variante atípica CnA β 1 que posee un dominio C-terminal único. La inhibición de CnA β 1 provoca la inactivación de la señalización de Akt/GSK3 β / β -catenina, lo que su vez se traduce en un defecto en la especificación a mesodermo. Hemos identificado un dominio específico en la segunda α -hélice de la región C-terminal que regula la activación de la vía de Akt/GSK3 β / β -catenina. Tras realizar un ensayo de doble híbrido en levadura, encontramos que CnA β 1 interacciona con Cog8 en el aparato de Golgi. La inhibición de Cog8 deslocaliza CnA β 1 e interfiere con la diferenciación a mesodermo de las ESC. En resumen, hemos determinado las bases estructurales para el mecanismo de acción de CnA β 1 y su función en la diferenciación de las ESC al linaje de mesodermo. Con el fin de caracterizar mejor la función de CnA β 1 *in vivo*, eliminamos la región C-terminal única de CnA β 1 por la eliminación del intrón 12-13, que llamamos CnA $\beta^{\Delta i12}$. Los ratones provenientes de esta construcción nacen de manera normal y no presentan ningún defecto a 2 meses de edad, pero con el tiempo desarrollan una hipertrofia cardíaca a los 15 meses. Curiosamente, la sobreexpresión de CnA β 1 en los cardiomiocitos, bajo el promotor de α -MHC, es capaz de disminuir los efectos de la hipertrofia cardíaca en un modelo de sobrecarga por presión. Estos resultados son opuestos a los descritos anteriormente para otras isoformas de calcineurina y sugieren su potencial uso para terapias.

SUMMARY

Alternative splicing plays a key role in embryonic stem cell (ESC) differentiation but the mechanisms involved remain poorly understood. Here, we show that Mbnl1 regulates the splicing of the calcineurin A β gene in mouse ESCs (mESC), resulting in expression of the atypical variant CnA β 1, which has a unique C-terminal domain. CnA β 1 knockdown results in inactivation of the AKT/GSK3 β / β -catenin signalling pathway, leading to defective mesoderm specification. We found that a specific motif in the second alpha helix of the C-terminal domain drives CnA β 1 localisation to the Golgi apparatus, which is necessary for the activation of the AKT/GSK3 β / β -Catenin pathway. Following a yeast 2-hybrid screening, we found that CnA β 1 interacts with Cog8 in the Golgi apparatus. Cog8 knockdown delocalises CnA β 1 and interferes with mESC mesodermal differentiation. In summary, we unveil here the structural basis for the mechanism of action of CnA β 1 and its role in the differentiation of mESC to the mesodermal lineage. To further unveil the function of CnA β 1 *in vivo* we have deleted the unique C-terminal region of this isoform by deleting intron 12-13, which we called CnA $\beta^{\Delta 12}$. These mice are born normally and do not present any defect at 2 months of age, however they developed cardiac hypertrophy by 15 months of age. Interestingly, the overexpression of CnA β 1 in the cardiomyocytes under the α MHC promoter is able to reduce cardiac hypertrophy in a mouse model of pressure overload. This result is opposite to the function described for other calcineurin isoforms and suggests its potential use for therapies.

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	9
RESUMEN	15
SUMMARY	17
ÍNDICE	21
ABREVIATURAS Y SIGLAS	25
INTRODUCCIÓN	31
Células troncales embrionarias y el desarrollo embrionario.....	31
El splicing alternativo regula el estado pluripotente y la diferenciación de células troncales	34
La calcineurina en células troncales.....	38
La calcineurina en la formación del corazón y el desarrollo de la hipertrofia.	41
La isoforma de calcineurina CnA β 1	44
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
Cultivos celulares	53
Aislamiento del RNA y realización de la qRT-PCR.....	55
Análisis de los datos de CLIP-Seq y alineamiento de los datos de RNA-Seq..	55
Análisis de MicroArrays.....	56
Análisis de proliferación celular	57
Western Blot	57
Co-inmunoprecipitación	58
Ensayo de Luciferasa.....	58
Predicción de la estructura de proteínas	59
Construcciones de DNA	60
Producción de RNA modificado	60
Inmunofluorescencias.....	61

Ensayo de doble híbrido en levadura	61
Ratones	62
Citometría de las células hematopoyéticas	64
Cirugías.....	64
Análisis Eco-cardiográfico	65
Análisis histológico.....	65
Análisis estadístico.....	66
RESULTADOS	75
Caracterización de la función de CnAB1 en células troncales embrionarias.....	75
CnAβ1 está enriquecida en células troncales embrionarias.....	75
CnAβ1 es necesaria para la diferenciación a mesodermo	75
CnAβ1 regula la especificación a mesodermo mediada por Akt, GSK3β y β-catenina.	81
La región C-terminal de CnAβ1 dirige su localización al aparato de Golgi	85
El dominio C-terminal de CnAβ1 interacciona con Cog8 y es necesario para su función.....	89
Regulación de la expresión de Calcineurina A beta 1	93
La regulación de la expresión de CnAβ1 es independiente de U1.....	93
La expresión de CnAβ1 está regulada por proteínas de unión al RNA.....	97
Caracterización de un ratón deficiente para el intrón 12-13 de Calcineurina a beta	100
Los ratones CnAβ ^{Δi12} son viables.....	100
Los ratones CnAβ ^{Δi12} no presentan alteraciones hematopoyéticas a dos meses de edad.....	101
Los ratones CnAβ ^{Δi12} desarrollan hipertrofia cardiaca a con la edad.....	103
La sobreexpresión de CnAβ1 en el corazón disminuye el remodelado tras la constricción aórtica	109
DISCUSIÓN.....	117
CnAβ1 regula la diferenciación a mesodermo controlando la señalización de Akt desde el Golgi.....	117

La expresión de CnA β 1 es independiente de U1 y está regulada por proteínas de unión al RNA.....	123
La isoforma de calcineurina CnA β 1 en el corazón tiene un efecto opuesto al resto de calcineurinas A.....	125
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFIA	137
MATERIAL SUPLEMENTARIO: TABLAS	153
MATERIAL SUPLEMENTARIO: PUBLICACIONES	167

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- **AS:** Corte y empalme alternativo (alternative splicing)
- **AW:** Pared anterior del ventrículo izquierdo
- **BASO:** Basófilos
- **BrdU:** Bromodeoxyuridina
- **BW:** Peso corporal
- **Cn:** Calcineurina:
- **CnA:** Calcineurina A: CnA
- **CnB:** Calcineruina B: CnB
- **CnA α :** Calcineurina A alfa
- **CnA β :** Calcineurina A beta
- **CnA γ :** Calcineurina A gamma
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **EF:** Fracción de eyección
- **ESC:** Células troncales embrionarias o Células troncales
- **EOS:** Eosinófilos
- **GEO:** Gene Expression Omnibus
- **GFP:** Proteína verde fluorescente
- **HCT:** Hematocrito
- **HGB:** Hemoglobina
- **HSC:** Células troncales hematopoyéticas
- **HW:** Peso del corazón
- **iPSC:** Células troncales pluripotentes inducidas
- **IVS:** Septo interventricular
- **mESC:** Células troncales embrionarias de ratón
- **modRNA:** Ácido ribonucleico modificado
- **LT-HSC:** Células troncales hematopoyéticas de tiempo largo
- **Luc:** Luciferasa
- **LV:** Ventrículo izquierdo
- **LVPW:** Pared posterior del ventrículo izquierdo
- **LYN:** Linfocitos
- **MCH:** Hemoglobina corpuscular media
- **MCHC:** Concentración de hemoglobina corpuscular media

- **MCV:** Volumen corpuscular medio
- **MONO:** Monocitos
- **MPP:** Células troncales mieloides
- **MPV:** Volumen piastrínico medio
- **NEUT:** Neutrófilos
- **NTC:** Control sin diana
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PDB:** Base de datos de proteínas
- **PFA:** Paraformaldehído
- **PLT:** Plaquetas
- **qRT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
- **RBC:** Glóbulos rojos
- **RDW:** Ancho de distribución eritrocitario
- **RNA:** Ácido ribonucleico
- **shRNA:** RNA horquillado de pequeño tamaño
- **siRNA:** RNA de interferencia de doble cadena
- **snRNA:** Ácidos ribonucleicos nucleares de pequeño tamaño
- **siRNP:** Partículas nucleares ribonucleoproteicas de pequeño tamaño
- **ST-HSC:** Células troncales hematopoyéticas de tiempo corto
- **TAC:** Constricción de la aorta
- **WBC:** Leucocitos

1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Células troncales embrionarias y el desarrollo embrionario

Las células troncales del ratón, y el humano, provienen del blastocisto, y son las células que dan origen a todas las estructuras del embrión y el organismo adulto (Hackett & Surani, 2014). Tras la fecundación del óvulo, el cigoto se divide 3 veces para formar un embrión de 8 células (Fig. 1 A). En éste estado las células del embrión aún son totipotentes, dado que cada una de ellas podría generar un embrión entero por sí mismas. A continuación, el embrión pasa a un estado compactado donde las células se unen formando una estructura esférica y cerrada (Fig. 1 A). Durante los siguientes 1-2 días se produce la primera diferenciación celular, donde unas células formarán el trofotodermo, que dará lugar a parte de las estructuras extraembrionarias y, por otro lado la masa de células interna que contiene las células tróncasles embrionarias (embryonic stem cells – ESC) que formarán el embrión (Fig. 1 A, B) (Hackett & Surani, 2014; Rayon et al, 2014). Ambos tipos celulares: trofotodermo y ESC pueden ser aisladas y cultivadas *in vitro*, pudiendo ser mantenidas en un estado indiferenciado o favorecer su diferenciación hacia linajes específicos.

La capacidad de las ESC para diferenciarse a otros tipos celulares ha sido muy útil para comprender los mecanismos moleculares implicados en la selección de linajes específicos durante el desarrollo embrionario (Martin-Puig et al, 2008). Por otro lado, la descripción de los mecanismos moleculares que regulan el mantenimiento de las ESC en cultivo ha favorecido la generación de células troncales pluripotentes inducidas (induced Pluripotent Stem Cells – iPSC) a partir de células diferenciadas (Takahashi et al, 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006; Yu et al, 2007). Recientemente, la mejora de los protocolos de diferenciación de ESC e iPSC hacia linajes específicos, como los cardiomiocitos o el epitelio pigmentado de la retina, está permitiendo su uso en ensayos preclínicos y clínicos respectivamente (Chong et al, 2014; Kamao et al, 2014), donde se está testando su potencial uso en terapias regenerativas. Por otro lado, el uso de iPSC generadas de pacientes con una enfermedad cardiaca,

neuronal, o incluso cáncer, que estén asociadas a una herencia genética de la enfermedad, están sirviendo para el estudio *in vitro* de éstas enfermedades, así como para el desarrollo y pruebas de nuevos fármacos (Canals et al, 2015; Carvajal-Vergara et al, 2010; Lee et al, 2015).

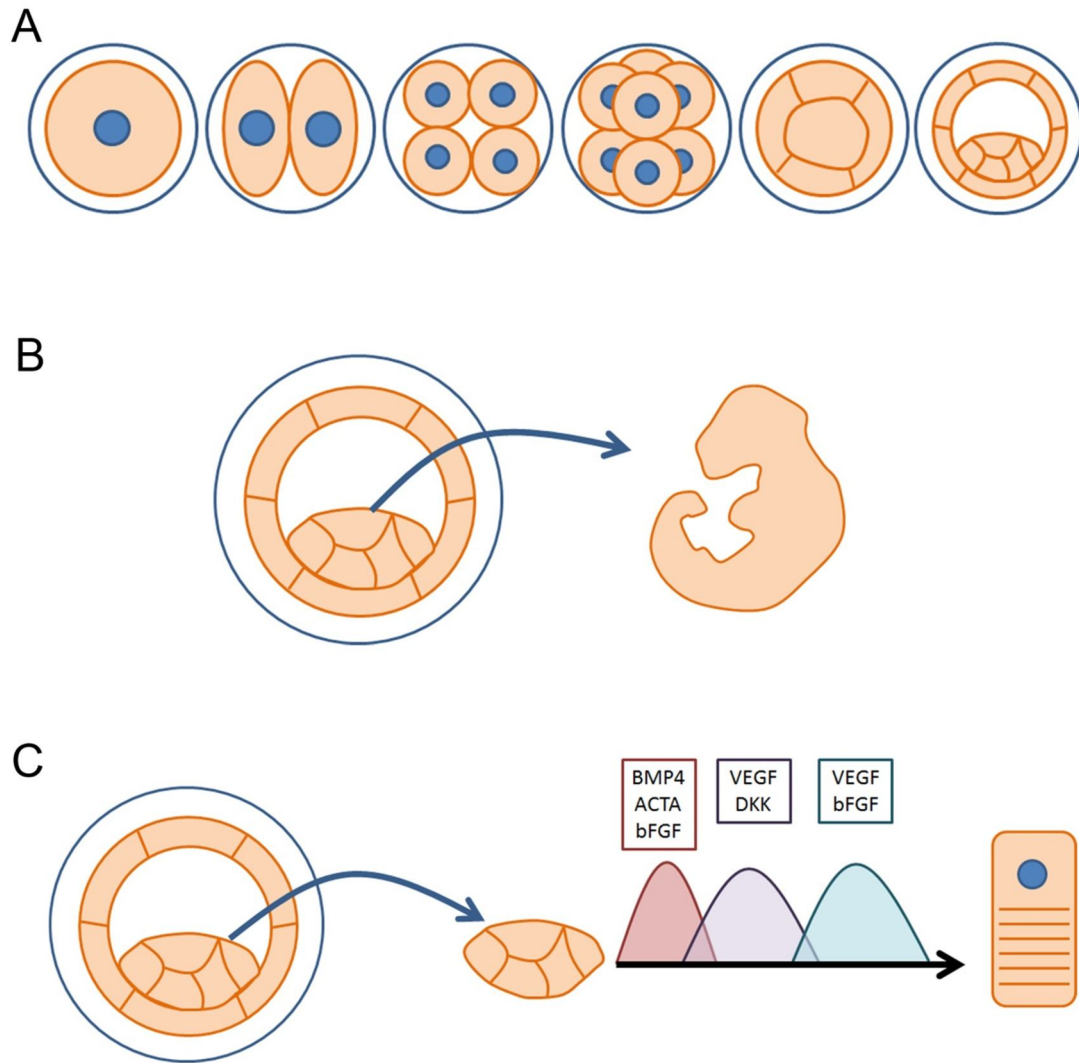


Figura 1. Las células troncales poseen la capacidad de formar todas las estructuras del embrión.

A, Durante el desarrollo temprano, el embrión está contenido dentro de la zona pelúcida y tras cada división sus células se hacen más pequeñas. Al llegar al estadio de 8 células, el embrión se compacta y sus células continúan dividiéndose a la par que se diferencian hacia células de trofotodermo (células externas) y células troncales (células internas) formando el blastocisto. **B,** Tras la implantación del blastocisto, las células troncales formarán todas las estructuras del embrión. **C,** Las células troncales se pueden mantener en cultivo y diferenciarlas hacia cualquier linaje embrionario y adulto. Para ello, se tratan con las señales que reciben durante el desarrollo y de esta forma se logra su correcta diferenciación hacia un linaje concreto.

Sin embargo, y pese a las actuales mejoras que han promovido los primeros ensayos preclínicos y clínicos, el control de la diferenciación hacia linajes específicos sigue siendo un reto en la actualidad, debido a la existencia de múltiples tipos celulares en los órganos adultos y a la regulación de su diferenciación por diferentes vías de diferenciación. Un claro ejemplo de ello es el cerebro donde existen diferentes poblaciones neuronales (Bond et al, 2015). Sin embargo, estas diferencias también podemos encontrarlas en otros órganos como el corazón donde los cardiomiocitos de la aurícula son diferentes a los del ventrículo, y en donde el origen embrionario de los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo o el derecho provienen de dos fuentes diferentes (Martin-Puig et al, 2008).

Otro problema añadido, es la maduración *in vitro* de estas células, ya que no logran alcanzar un estado de diferenciación como el que hay en los órganos adultos. Algunos estudios sugieren que el cultivo prolongado y/o el trasplante favorecen la maduración de las células diferenciadas (Tabar & Studer, 2014; Yang et al, 2014). Uno de los factores que se ha sugerido como problemático en el mecanismo de maduración es el escaso conocimiento de los procesos que acontecen durante el periodo neonatal. Durante este periodo, los órganos pasan de un estado embrionario con una alta proliferación a un estado más maduro donde tienen que adaptarse a cambios metabólicos y fisiológicos. Si bien algunos modelos han tratado de compensar la falta de estrés mecánico del músculo u otras situaciones similares que acontecen en el órgano, la maduración de éstas células *in vitro* sigue sin ser completa (Tabar & Studer, 2014). Por otro lado, y con el fin de no activar una respuesta inmunológica, el uso de iPSC diferenciadas es una mejor opción que el uso de ESC no autólogas. Sin embargo, las iPSC pueden activar la respuesta inmunológica por la sobreexpresión de antígenos (Zhao et al, 2011; Zhao et al, 2015). Curiosamente, esta sobreexpresión no sucede por igual en todos los linajes (Zhao et al, 2015), sugiriendo que algunas enfermedades podrán ser tratadas de una forma más eficaz con su uso que otras. Así mismo, estos resultados sugieren que los protocolos de diferenciación desde iPSC deberán tener en cuenta los niveles de antígenos presentes, así como su maduración.

Todo esto hace que el estudio de la regulación de las vías de señalización que controlan el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación sigan siendo estudiadas. Así mismo, existen diferentes estados pluripotentes en los que las células poseen propiedades especiales (Hackett & Surani, 2014; Tonge et al, 2014; Wu et al, 2015). Las células embrionarias del ratón cultivadas in vitro se parecen más a las células de la masa de células interna que hay en el blastocisto, mientras que las células humanas se parecen más a las células del epiblasto que, aun siendo pluripotentes, se encuentran en un estado embrionario más avanzado. Por otro lado, algunas vías de señalización se han relacionado tanto con el estado pluripotente como con la diferenciación de éstas células, lo que sigue fomentando el estudio de los mecanismos implicados en la regulación de estos procesos (Lindsley et al, 2006; Miyabayashi et al, 2007; Naito et al, 2005; Niwa et al, 2009; Watanabe et al, 2006).

La regulación de la diferenciación y maduración de las células embrionarias hacia diferentes linajes es un proceso muy complejo donde la activación de diferentes señales debe producirse en el momento correcto y con un estímulo adecuado (Dubois et al, 2011; Kattman et al, 2011). Es por ello que, todos los estudios de diferenciación celular, se basan en los estudios previos de biología del desarrollo para intentar imitar las señales que reciben las células durante su proceso natural para diferenciarlas hacia el linaje apropiado (Fig. 1 C). No obstante, y aunque en la actualidad poseemos grandes conocimientos de los mecanismos moleculares que suceden, aún nos faltan por conocer la función de muchos de los genes y moléculas involucradas.

El splicing alternativo regula el estado pluripotente y la diferenciación de células troncales

Un problema añadido a la caracterización de la función de cada gen es la producción de proteínas diferentes por parte de éstos. Así mismo, estas proteínas en ocasiones regulan vías de señalización diferentes, lo que ha suscitado un gran interés en la actualidad por su caracterización. La generación de proteínas diferentes a partir de un mismo gen se debe a que la región codificante de los genes que están en nuestro ácido desoxirribonucleico (Deoxyribo-

nucleic acid – DNA) no se encuentran como una unidad continua sino que, la región codificante denominada exón, está separada por otras regiones no codificantes denominadas intrones (Fig. 2 A). Al transcribirse un gen, la cadena mensajera de ácidos ribonucleicos (Messenger Ribonucleic Acid – mRNA) que contiene los exones e intrones es cortada para juntar los exones contiguos entre sí, eliminando los intrones (Lara-Pezzi et al, 2013). Este proceso está controlado por una maquinaria formada por ácidos ribonucleicos nucleares de pequeño tamaño (small nuclear RNAs – snRNA), que interaccionan con un conjunto de proteínas para formar las partículas nucleares ribonuceoproteicas de pequeño tamaño (small nuclear ribonuceoprotein particles – snRNP), encargadas de cortar y pegar un exón con otro (Lara-Pezzi et al, 2013).

La unión de los exones sucede de manera co-transcripcional de manera que según se van transcribiendo los nuevos exones, se van uniendo al anterior (Djebali et al, 2012; Tilgner et al, 2012). Sin embargo, este no es un proceso cerrado, donde todos los exones de un gen tienen que ir en la cadena final de mRNA. Aproximadamente el 95% de los genes con múltiples exones poseen varias isoformas producidas por un cambio en la inclusión o exclusión de uno de sus exones (Pan et al, 2008). Cada gen puede expresar hasta 10 a 12 isoformas en una condición dada (Djebali et al, 2012), aunque tan solo 1 de todas esas isoformas será mayoritaria y dominará sobre la expresión del resto en dicha condición (Djebali et al, 2012). Este proceso de generación de múltiples isoformas por la unión de diferentes exones se conoce como proceso de corte y empalme alternativo (Alternative Splicing – AS). La regulación de la incorporación o exclusión de un exón del transcrito final está regulada por un tipo de proteínas de unión al RNA que se denominan factores de splicing (Fig. 2 A).

Las proteínas reguladores del AS se unen a secuencias específicas en los exones o los intrones y favorecen o impiden la unión de los complejos de snRNP que, posteriormente, se encargarán de la unión de los exones entre sí (Fig. 2 A). Aunque las proteínas reguladoras del AS se han agrupado durante años en dos categorías como factores que promueven la inclusión y, factores que favorecen la exclusión de exones, en la actualidad se ha demostrado que

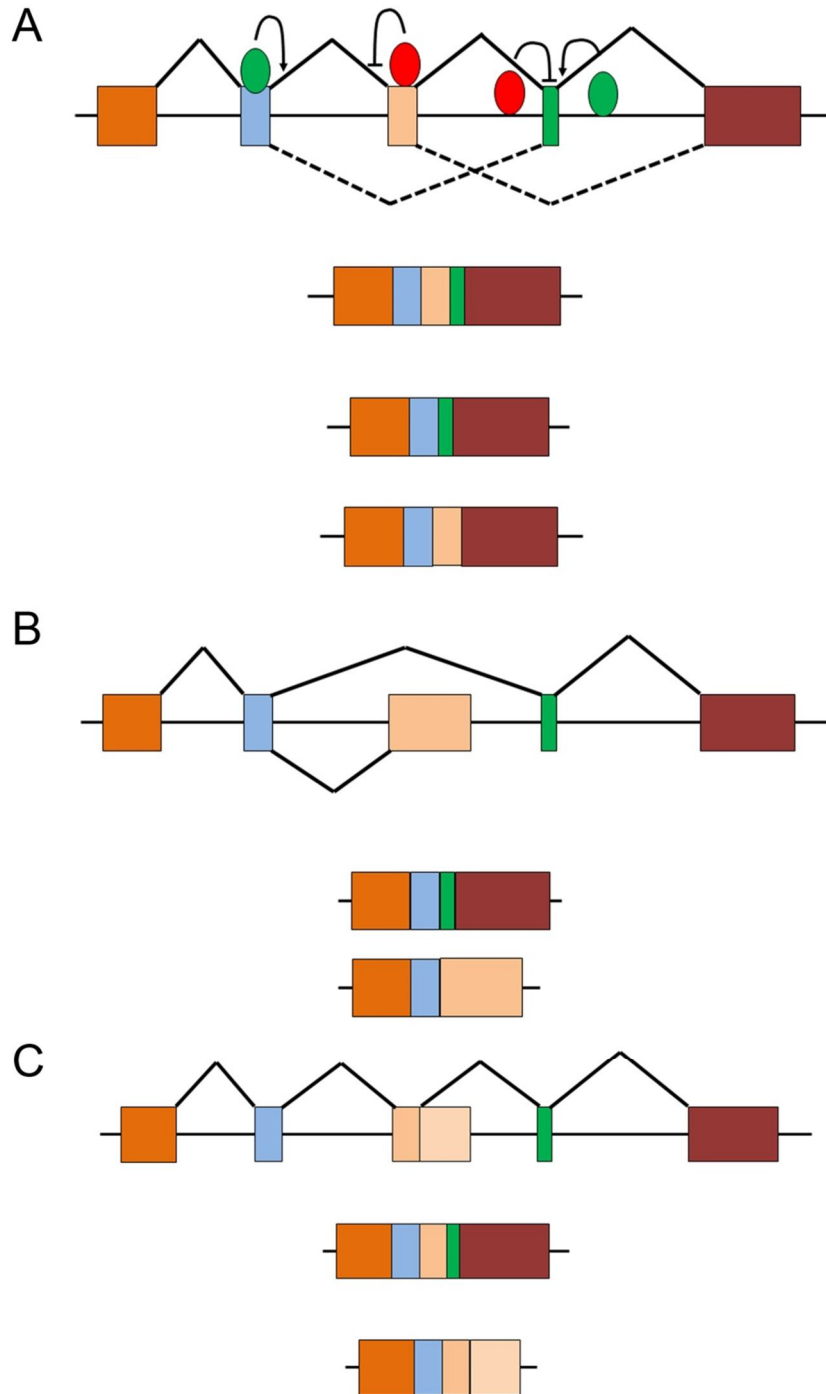


Figura 2. La unión de los factores de splicing favorece o impide la incorporación de exones en el transcrito final. **A**, La incorporación de exones al transcrito final está modulada por la unión de los factores de splicing. Los factores de splicing se pueden unir tanto a regiones exónicas o codificantes (regiones en colores) como intrónicas o no codificantes (línea negra) para regular la inclusión de un exón. Según el efecto promovido por el factor de splicing las regiones a las que se unen se clasifican como favorecedoras o inhibidoras el splicing. **B**, Algunos exones incluidos por este proceso poseen un sitio de polyadenilación alternativo que, al incluirse el exón, es activado y genera un transcrito sin el resto de los exones. **C**, En otras ocasiones, los sitios alternativos de poliadenilación se encuentran entre dos exones, y cuando se activan generan un transcrito más corto.

muchos de estos factores pueden actuar de una u otra forma dependiendo de la zona en la que se unan, y los factores que los rodean (Huelga et al, 2012).

Por otro lado, en ocasiones, algunos de estos exones activan un sitio de poliadenilación alternativo, donde la cadena de mRNA es cortada apareciendo un final alternativo (Djebali et al, 2012; Elkon et al, 2013). Las señales de poliadenilación alternativa que dan origen a una proteína diferente se agrupan mayoritariamente en dos grupos: aquellas generadas por un exón alternativo (Fig. 2 B), y las formadas por la extensión de un exón común a ambos transcritos (Fig. 2 C) (Elkon et al, 2013). La producción de estos transcritos alternativos es regulada por la maquinaria del AS, pero también por proteínas de reconocimiento de la secuencia de poliadenilación.

Durante la diferenciación de las células embrionarias se induce la expresión de algunas proteínas reguladoras del AS, como Muscleblind like 1 (Mbnl1) y Muscleblind like 2 (Mbnl2) (Han et al, 2013). La inhibición de ambas proteínas en células diferenciadas favorece la formación de iPSC, mientras que su inducción en células embrionarias promueve su diferenciación (Han et al, 2013). Así mismo, también se ha descrito que estas proteínas regulan el splicing en los progenitores musculares (Wang et al, 2012), y están involucradas en el desarrollo de la distrofia muscular (Lara-Pezzi et al, 2013), sugiriendo que el papel del AS es muy importante en el control de múltiples procesos fisiológicos.

No obstante, aunque Mbnl1 como Mbnl2 son dos proteínas que regulan el AS, así como otros procesos relacionados con la estabilidad y localización del mRNA (Wang et al, 2012), las consecuencias de los cambios en el AS de sus dianas no han sido completamente descritas. La función de otros factores de splicing en la regulación de este proceso también ha sido analizada, como la del factor SFRS2 que es inducido por el factor de pluripotencia Oct4 (Lu et al, 2014) o la proteína SON que regula el correcto procesamiento de los genes que mantienen la pluripotencia (Lu et al, 2013). Curiosamente, el factor de splicing SFRS2 regula el splicing de dos isoformas del gen MBD2, involucrado en la modificación epigenética del DNA (Lu et al, 2014). Pese a que ambas isoformas se unen a la región promotora de los genes de pluripotencia, tan sólo la

isoforma MBD2a es capaz de interaccionar con el complejo NuRD y promueve la inactivación del promotor por una modificación epigenética. Por otro lado, la isoforma MBD2c también se une al promotor, pero no afecta a su expresión al no interaccionar con dicho complejo, permitiendo la expresión de los genes de pluripotencia.

Otro ejemplo de cómo el AS en un gen puede tener grandes implicaciones a nivel funcional lo encontramos en el factor de transcripción FOXP1 (Gabut et al, 2011). Los factores de transcripción son proteínas que se unen a la región promotora de los genes y favorecen su expresión. Su unión a la región promotora se realiza por un dominio de unión a una secuencia específica de nucleótidos en el DNA. Curiosamente, el dominio de unión al DNA en FOXP1 se encuentra en un exón regulado por AS, donde hay dos exones mutuamente exclusivos que codifican para un dominio de unión al DNA diferente (Gabut et al, 2011). Uno de los dominios de unión codifica para una secuencia que se encuentra en los promotores de genes involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia, mientras que el otro está en genes relacionados con la diferenciación celular. De esta forma, controlando la inclusión o exclusión de cada uno de éstos exones se favorece un estado celular u otro.

La calcineurina en células troncales

Las fosfatasa de la familia de calcineurina desempeñan un papel relevante en gran variedad de procesos, incluyendo el desarrollo embrionario y las enfermedades del corazón. La calcineurina es una enzima formada por dos subunidades: la subunidad A posee la actividad catalítica, que en su caso es una fosfatasa, y la subunidad B se une fuertemente a la subunidad A y tiene una acción reguladora y estabilizadora (Fig 3 A) (Li H et al, 2011). La falta de la subunidad B desestabiliza la subunidad A y ésta es degradada. La subunidad A posee 3 isoformas codificadas por 3 genes diferentes: calcineurina A alfa ($CnA\alpha$), calcineurina A beta ($CnA\beta$) y, calcineurina A gamma ($CnA\gamma$), de las cuales $CnA\alpha$ y $CnA\beta$ se expresan en todos los tejidos, mientras que $CnA\gamma$ se expresa en los testículos y el cerebro (Fig. 3 A) (Medyouf & Ghysdael, 2008). Por otro lado, la subunidad B tiene dos isoformas codificadas por dos genes:

CnB1 y CnB2. La subunidad catalítica (CnA) posee junto al dominio catalítico 3 dominios que sirven para regular su actividad: un dominio de unión de CnB, un dominio de unión de calmodulina, y un dominio autoinhibidor (Fig. 3 B).

La actividad de calcineurina se encuentra regulada por la liberación de calcio al citoplasma celular (Fig. 3 C). El calcio activa la proteína calmodulina, que se une a la subunidad A de calcineurina. La unión de calmodulina favorece la liberación del dominio autoinhibidor de calcineurina que bloquea el sitio catalítico, quedando en un estado activado (Hogan et al, 2003; Ke & Huai, 2003; Medyouf & Ghysdael, 2008). Una de las principales dianas de calcineurina es el factor nuclear de activación de células T (Nuclear Factor of Activated T cells – NFAT), cuya forma inactiva se encuentra fosforilada. La proteína NFAT es un factor de transcripción que posee 4 isoformas: NFATc1, NFATc2, NFATc3 y NFATc4. En respuesta a la liberación de calcio, calmodulina se une a calcineurina y expone su dominio catalítico, éste desfosforila NFAT, el cual se transloca al núcleo y activa la expresión de diversos genes.

Recientemente se ha descrito que las células embrionarias expresan altos niveles del factor de transcripción NFATc3 y, al diferenciarse los niveles de expresión de ésta y de NFATc4, aumentan (Li X et al, 2011). Así mismo, se ha descrito que la inhibición de la actividad de calcineurina por ciclosporina A, que se une a ciclofilina e inhibe la diferenciación de las células embrionarias a cualquier linaje, manteniéndolas en un estado no diferenciado (Li X et al, 2011). Por otro lado, la inhibición con RNA de interferencia de la subunidad reguladora CnB1 disminuye la expresión de genes de diferenciación, mientras que la activación de la vía de NFAT con una isoforma de CnA o NFAT constitutivamente activadas, promueve la diferenciación de las células (Li X et al, 2011). Por último, la inhibición de calcineurina con ciclosporina A en embriones tempranos en cultivo (cigoto a blastocisto) impide su correcto desarrollo hasta blastocisto demostrando su importancia en la formación del embrión (Li X et al, 2011).

La caracterización de la función de la subunidad reguladora CnB1 durante el desarrollo embrionario se ha descrito recientemente mediante el uso de

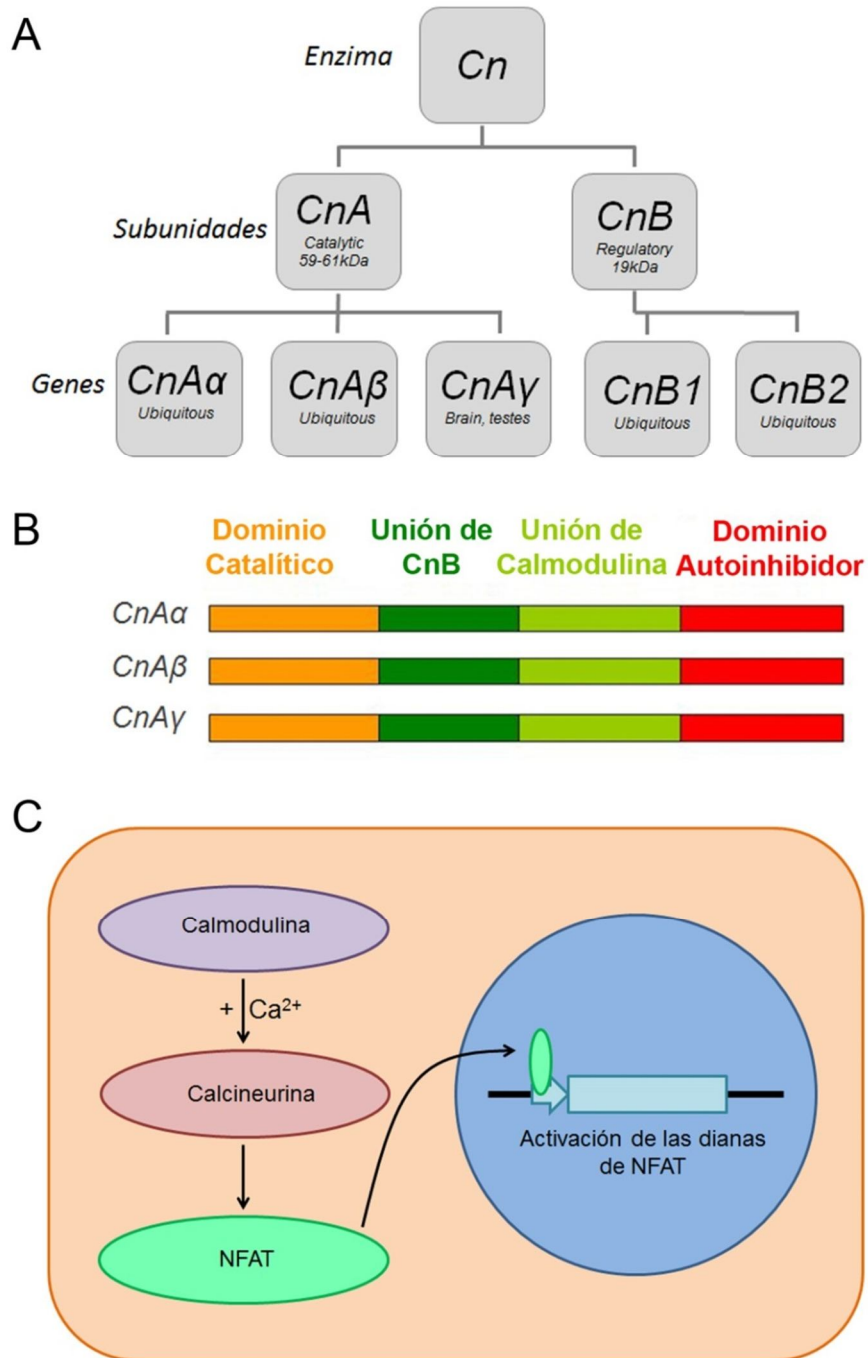


Figura 3. Regulación del mecanismo de acción de calcineurina. **A**, La calcineurina (Cn) es un enzima formado por dos subunidades: CnA (catalítica) y CnB (reguladora). La subunidad A está codificada por 3 genes: CnA α , CnA β y CnA γ . La subunidad B está codificada por dos genes: CnB1 y CnB2. **B**, Todas las subunidades de calcineurina A poseen una estructura similar con: un dominio catalítico en la región N-terminal, seguido de un dominio de unión a CnB, un dominio de unión a calmodulina, y un dominio autoinhibidor en la región C-terminal. **C**, En respuesta a la liberación de calcio al citoplasma celular, calmodulina se activa y se une a calcineurina. La unión de calmodulina favorece la liberación del dominio autoinhibidor de calcineurina de su bolsillo catalítico, que queda disponible para desfosforilar sus sustratos. Uno de los principales sustratos de calcineurina es el factor de transcripción NFAT, que se encuentra en un estado inactivo cuando está fosforilado. NFAT queda activado tras la unión de calcineurina y se transloca al núcleo donde activa diferentes genes diana.

una mutación puntual que inhibe su actividad (Cho et al, 2014). Los embriones con esta mutación presentan defectos en la formación del cerebro. Curiosamente, en éste caso, la señalización de calcineurina regula la desfosforilación de las proteínas SMAD1/5 e inhibe la expresión de sus dianas en el DNA (Cho et al, 2014). No obstante, estos ratones siguen expresando la proteína reguladora CnB2, que puede compensar parte de la falta de CnB1.

La calcineurina en la formación del corazón y el desarrollo de la hipertrofia

Durante el desarrollo embrionario, el corazón es el primer órgano en formarse, siendo el proceso de transformación desde el tubo cardiaco primitivo hasta su estructura madura un paso de extrema importancia durante el desarrollo (SM et al, 2010). Actualmente se conocen algunas de las moléculas que regulan su formación. No obstante, un mayor conocimiento de estos mecanismos es aun necesario, especialmente debido a que las malformaciones cardiacas congénitas siguen ocupando el primer puesto en los defectos congénitos humanos a nivel mundial, alcanzando el 1% de los recién nacidos (Mozaffarian et al, 2015). Además, entre un 1-2% de la sociedad desarrolla malformaciones cardiacas con la edad (Mozaffarian et al, 2015). Estas malformaciones congénitas contribuyen a que los problemas cardiovasculares sean la primera causa de muerte en el mundo occidental (Mozaffarian et al, 2015).

En concreto, la calcineurina regula la formación de las válvulas cardiacas en el corazón embrionario (de la Pompa et al, 1998; Ranger et al, 1998). En el adulto, la expresión de una isoforma constitutivamente activa de calcineurina en los cardiomiocitos promueve el desarrollo de una hipertrofia mal adaptativa (Molkentin et al, 1998). Curiosamente, la eliminación de CnA β no se ha descrito que produzca un fenotipo embrionario adverso, pero impide el desarrollo de la hipertrofia en dos modelos donde se induce una sobrecarga de presión en el corazón (Bueno et al, 2002). Es por ello, que existe un gran interés en comprender su regulación con el fin de tratar diversas enfermedades cardiacas.

En el corazón adulto, la calcineurina activa el factor de transcripción NFAT y promueve el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (Bueno et al, 2002; Molkenstein et al, 1998). Este proceso consiste en el aumento del tamaño del corazón por un incremento en el tamaño de los cardiomiocitos en respuesta a un incremento en la demanda para bombear la sangre. Inicialmente, esta respuesta se produce como una adaptación a la situación de estrés, pero si esta se mantiene a lo largo del tiempo el proceso de remodelado comienza a alterar la función cardíaca apareciendo una hipertrofia mal adaptativa (Fig. 4) (Jessup & Brozena, 2003; Lyon et al, 2015). Este tipo de hipertrofia se caracteriza por el remodelado del corazón, donde puede observarse un incremento de fibrosis perivascular alrededor de los grandes vasos, y posteriormente la aparición de fibrosis intersticial (Jessup & Brozena, 2003). Así mismo, con el paso del tiempo, el corazón, inicialmente engrosado comienza a perder su capacidad de contracción y comienza a dilatarse (Jessup & Brozena, 2003; Jiang et al, 2014). Este proceso favorece el cambio hacia una forma más redondeada de la estructura del corazón (Fig. 4). Con el tiempo, esta dilatación termina disminuyendo el grosor de la pared del corazón, y aumenta la pérdida de capacidad contráctil (Jessup & Brozena, 2003; Jiang et al, 2014). Un problema asociado a esta enfermedad es que la pérdida de contracción disminuye el volumen de sangre que sale del corazón por el ventrículo izquierdo, aumentando la presión en la aurícula izquierda, que provoca la acumulación de sangre en los pulmones. Con el paso del tiempo, esto termina por afectar al ventrículo derecho, y a los pulmones donde se producen edemas por la acumulación de líquido, provocando una insuficiencia cardíaca que se manifiesta por un aumento del cansancio, la falta de aliento y la retención de líquidos entre otras (Hunt et al, 2009; Jessup & Brozena, 2003).

Por otro lado, el infarto de miocardio, aunque no puede considerarse como un modelo de hipertrofia cardíaca, provoca que se desarrolle una hipertrofia en la región no infartada debido a que el corazón trata de compensar la falta de masa cardíaca perdida (Sutton & Sharpe, 2000). Uno de los principales problemas en el infarto de miocardio es que la región infartada es reemplazada por una matriz fibrótica. Con el paso del tiempo, los fibroblastos que la mantienen van muriendo, y esta matriz comienza a ser menos compacta y se estira

(López-Olañeta et al, 2014). Este proceso favorece aún más la hipertrofia del resto del corazón que tiene que compensar el incremento de volumen asociado al remodelado del infarto, lo que produce la aparición de fibrosis en la región no infartada, promoviendo una peor contracción del corazón y el desarrollo de la insuficiencia cardiaca.

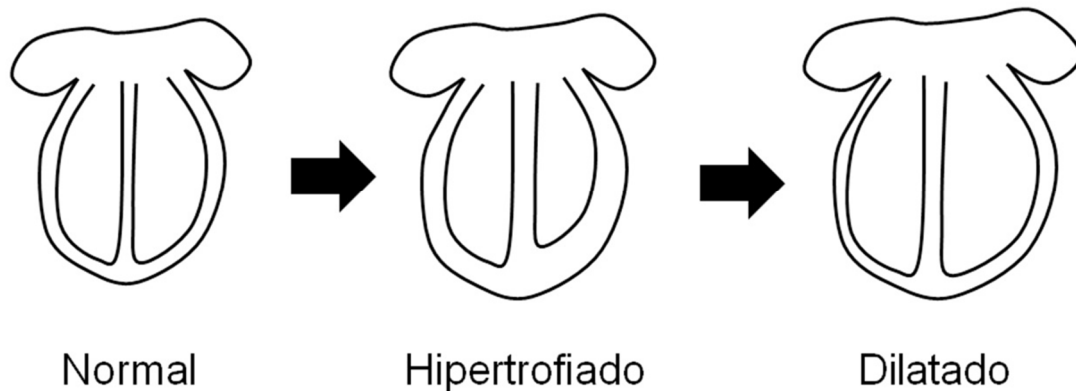


Figura 4. Fases del remodelado cardíaco por el aumento de presión ventricular. El remodelado del corazón que acontece por un aumento de la presión produce una hipertrofia inicial del músculo cardíaco para intentar compensar el incremento de demanda contráctil. Si este problema se mantiene, el corazón comienza a sufrir un remodelado que promueve la aparición de fibrosis perivascular e intersticial que impide la correcta contracción del corazón y su función, promoviendo su dilatación.

Curiosamente, la actividad de calcineurina se ha asociado con el desarrollo de la hipertrofia mal adaptativa, pero no de la hipertrofia fisiológica (Wilkins et al, 2004). En ratones, el estudio de ésta enfermedad se realiza por el incremento de presión a nivel de la aorta, bien reduciendo su diámetro mediante una ligadura o bien mediante el incremento de la presión sistémica con bombas de angiotensina (Crowley et al, 2006; Patten & Hall-Porter, 2009; Wilkins et al, 2004). Por otro lado, el estudio del infarto de corazón se realiza por la ligadura de una de las arterias coronarias en el ventrículo izquierdo. En este caso, la ligadura puede ser permanente, o puede quitarse al cabo de un tiempo, imitando en este caso un infarto con reperfusión. La actividad de calcineurina medida por la inducción de la actividad de NFAT ha sido analizada en ratones, al menos, en dos modelos de fallo cardíaco: uno por la ligadura de la aorta, y otro en un infarto con ligadura permanente (Wilkins et al, 2004). En ambos modelos se ha observado una inducción significativa de la actividad de NFAT a lo largo del tiempo, y mantenida, que indica la relación de esta vía de

señalización con el proceso de ésta enfermedad. Sin embargo, estos resultados no se obtuvieron en modelos de hipertrofia fisiológica, sugiriendo que los mecanismos moleculares que generan ambas son diferentes.

La isoforma de calcineurina CnA β 1

Nuestro laboratorio ha descrito recientemente la existencia de una isoforma de CnA β denominada CnA β 1, que a diferencia del resto de isoformas de calcineurina A no posee la secuencia del dominio autoinhibidor (Fig. 5 A) (D Guerini & Klee, 1989; Felkin et al, 2011; Lara-Pezzi et al, 2007; López-Olañeta et al, 2014). Esto se debe a que la región que genera este dominio se encuentra codificada en el gen de CnA β por los exones 13 y 14, que no se encuentran en CnA β 1. La producción de esta isoforma se debe a la selección de un sitio de poliadenilación entre los exones 12 y 13, que genera la aparición de una región C-terminal diferente del dominio C-terminal del resto de calcineurinas, y distinto también del resto de proteínas conocidas. La isoforma que posee el dominio autoinhibidor se ha denominado CnA β 2, y es homóloga a CnA α y CnA γ . Curiosamente, la producción de una isoforma sin el dominio autoinhibidor típico de estas proteínas es específica del gen CnA β , no encontrándose en los otros genes.

La isoforma CnA β 1 no activa de forma natural la vía de NFAT, como el resto de calcineurinas, por el contrario favorece la activación de la ruta de Akt en el músculo y el corazón (Felkin et al, 2011; Lara-Pezzi et al, 2007; López-Olañeta et al, 2014). La activación de esta ruta por CnA β 1 promueve la regeneración del músculo esquelético favoreciendo la proliferación de los mioblastos por la inhibición de FoxO3a, y en el corazón protege contra los devastadores efectos del infarto y mejora la función cardíaca, reduciendo la inflamación y la formación de tejido fibrótico.

Curiosamente, la activación de Akt de forma constitutiva en el corazón promueve el desarrollo de hipertrofia (Matsui et al, 2002). Sin embargo, la so-

breexpresión de CnA β 1 en el corazón no produce ningún cambio fisiológico en condiciones normales, pese a incrementar los niveles de activación de Akt (Felkin et al, 2011). Esto puede ser debido a que la activación de Akt mediada por CnA β 1 no es tan elevada como la generada por el modelo de sobreexpresión de una isoforma de Akt miristoilada.

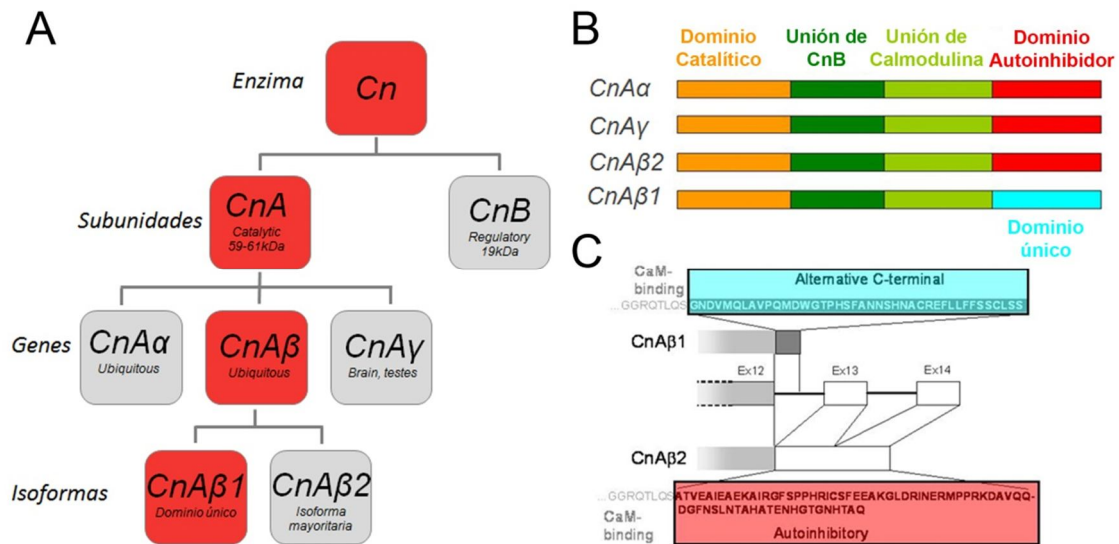


Figura 5. El gen CnA β codifica una isoforma cuyo dominio autoinhibidor es sustituido por un dominio único. **A**, El gen de calcineurina A CnA β codifica, al menos, dos isoformas cuya región C-terminal es diferente denominadas CnA β 1 y CnA β 2. **B**, La isoforma CnA β 1 sustituye el dominio autoinhibidor por un dominio único diferente del dominio C-terminal del resto de calcineurinas y del resto de proteínas conocidas. **C**, El dominio único de CnA β 1 se produce por una extensión del exón 12 y está asociada al reconocimiento de un sitio de poliadenilación alternativo entre los exones 12 y 13.

La vía de Akt ha sido muy estudiada durante los últimos años por su relación con diversas patologías como el cáncer, pero también por su contribución en el mantenimiento y la diferenciación de células embrionarias. Aunque recientemente han aparecido algunos artículos relacionando otras isoformas de calcineurina con el desarrollo embrionario temprano y la pluripotencia de las ESC, el papel de CnA β 1 en estos procesos es completamente desconocido. Así mismo, las diferentes funciones de Akt en el mantenimiento de la pluripotencia o la diferenciación de las ESC (Naito et al, 2005; Niwa et al, 2009; Watanabe et al, 2006) sugieren que diferentes moléculas controlan su función dentro de la célula.

Pese a que la función de otras isoformas de calcineurina se han descrito en células troncales, el desarrollo embrionario, o en la función del corazón adulto, la función de ésta nueva isoforma, CnA β 1, aun no ha sido estudiada en estos contextos, salvo en el corazón, usando un modelo de ganancia de función. Teniendo en cuenta las peculiaridades de ésta isoforma, en la presente tesis se estudiará porqué su región C-terminal le confiere unas propiedades diferentes del resto de calcineurinas, así como su función en el mantenimiento y la diferenciación de células troncales, y su función en el corazón adulto mediante un modelo de pérdida de función.

2

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Identificar el papel de CnA β 1 en las células troncales embrionarias de ratón.
2. Identificar el mecanismo molecular regulado por CnA β 1.
3. Describir el mecanismo que regula la producción de CnA β 1 y CnA β 2.
4. Determinar la función de CnA β 1 en el adulto, específicamente en el corazón.

3

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

La línea de células embrionarias R1 se cultivó sobre fibroblastos embrionarios de ratón irradiados en medio modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con L-glutamina (2mM), aminoácidos no esenciales (1X), β -mercaptoetanol (50 μ M), 15% suero bovino y LIF (medio de suplementación) a 37°C con una tensión de CO₂ del 5%. Las células embrionarias se pasaron cada dos días durante su cultivo en condiciones de pluripotencia usando tripsina (Sigma). Para los ensayos de diferenciación, las células fueron tripsinizadas y cultivadas durante 1 hora en medio pluripotente en placas recubiertas con 0.1% de gelatina para eliminar los MEF por adherencia. Para la diferenciación a mesodermo se usó el método de la gota colgante con una concentración celular de 5×10^4 células/ml (1000 células por cada gota de 20 μ l) en medio DMEM suplementado con L-glutamina (2mM), aminoácidos no esenciales (1X), β -mercaptoetanol (50 μ M) y 20% suero bovino (Bondue et al, 2008). El segundo día de la diferenciación se recogieron los cuerpos embrionarios formados en las gotas y se cultivaban hasta el día 5 en placas no tratadas con el medio de diferenciación. A partir del día 5 los cuerpos embrionarios se pasaban a placas de cultivo tratadas con 0.1% de gelatina. Para la diferenciación a progenitores de neuroectodermo, las células se trataron con medio DMEM suplementado con L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (1X), β -mercaptoetanol (50 μ M) y 10% de solución de remplazo del suero para knockouts (KSR) (Kamiya et al, 2011). Las células embrionarias se transfectaron en suspensión con una concentración de RNA de interferencia de 20 pico moles (Tabla 1 y 2) o 1 μ g de RNA modificados (modRNA) junto con 3 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en pocillos de p24. Estas condiciones fueron determinadas experimentalmente como las mejores para la inhibición y sobreexpresión en las células R1, y son similares a otras previamente publicadas (Ko et al, 2009). Para la sobreexpresión no se usaron plásmidos debido a que la expresión bajo el promotor de CMV, donde tenemos todas las construcciones del laboratorio, es muy baja (Chung et al, 2002), y el uso de los RNA modificados se ha demostrado como una alternativa eficaz (Warren et al, 2010; Zangi et al, 2013). Tras la transfección, las células fueron

recogidas y diferenciadas a mesodermo o mantenidas en condiciones de pluripotencia, según fuese requerido. Para la inhibición de GSK3 β se utilizó LiCl. Las células pluripotentes fueron transfectadas con los RNA de interferencia contra CnA β 1 o un RNA de interferencia control y diferenciadas hacia mesodermo. El segundo día de la diferenciación se recogieron las células y se trataron con LiCl 20 mM durante 8 horas en medio de diferenciación para inhibir GSK3 β . A continuación se cambió el medio de las células y se volvió a poner medio de diferenciación sin LiCl hasta el día 4, en el que se analizó la expresión de los marcadores de diferenciación celular.

Las células P19 se mantuvieron en medio DMEM suplementado con L-glutamina (2 mM), β -mercaptoetanol (50 μ M) y 10% suero bovino. Estas células fueron transfectadas en suspensión con Lipofectamina 2000 sobre cubreobjetos de cristal tratados con gelatina al 1%. Las células se fijaron 24 horas después de la transfección en paraformaldehído al 4%. En el estudio de la deslocalización de CnA β 1 tras la inhibición de Cog8, las células fueron transfectadas con los RNA de interferencia de Cog8 y a las 48 horas se transfectaron con la construcción GFP-CnA β 1. Las células se fijaron 6 horas después de terminar la transfección y se realizó una inmunofluorescencia para GFP, Cog8 y GM130. Las células positivas para GFP en las que Cog8 había sido interferido fueron seleccionadas para su análisis.

Las células 293T se mantuvieron en medio DMEM suplementado con L-glutamina (2 mM), y 10% suero bovino. Los experimentos de co-inmunoprecipitación se realizaron tras la transfección de los plásmidos GFP, GFP-CnA β 1 o GFP-CnA β 1mut. Para el tratamiento con los morpholinos las células fueron tratadas con una concentración de 10 μ M de morpholino junto al reactivo EndoPorter (5 μ l/ml). La secuencia de los morpholinos usados se encuentra en la Tabla 3. Para la inhibición de la expresión de hnRNPF se infectaron las células con los correspondientes lentivirus durante 16 h en presencia de polibreno (10 μ g/ml). Los lentivirus facilitan la expresión de un shRNA contra hnRNPF, o dos controles, uno contra Luciferasa y otro con una secuencia sin diana (Non Targeting Control - NTC). Los lentivirus fueron producidos y testados por la Unidad de Vectores Virales del CNIC. Para la selección de clones

positivos se usó una MOI = 1 y una selección con puromicina que duró 4 días, comenzando el día 3 tras la infección.

Aislamiento del RNA y realización de la qRT-PCR

Se aisló RNA de las células o tejidos usando el kit de extracción de Qiagen RNeasy Mini Kit, siguiendo las indicaciones del fabricante y tratando las muestras con DNAsa para evitar la amplificación de DNA genómico que pudiese interferir en la detección de CnAβ1 u otro gen. Para la síntesis del cDNA se usaron 100 ng de RNA total por muestra y el kit de Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription, que usa cebadores seleccionados aleatoriamente para la reacción (random primers). El cDNA se amplificó con los cebadores (primers) indicados en la Tabla 4 y 5. Para la PCR cuantitativa (quantitative Real Time PCR - qRT-PCR) se usó el equipo de Applied Biosystems 7900 Fast real time PCR usando SYBR Green para la detección y cuantificación de DNA de cadena doble o sondas TaqMan como se indica en las Tablas 4 y 5. Los resultados fueron analizados con el programa LinReg. Los valores obtenidos fueron normalizados con GAPDH, 18S o los exones 2-3 de CnAβ según se indica en cada figura.

Análisis de los datos de CLIP-Seq y alineamiento de los datos de RNA-Seq.

Para el análisis de los datos de hnRNPF se descargaron los ficheros alineados bed de GSE34992 desde la base de datos de Gene Expression Omnibus (GEO), alineados contra el genoma humano (hg18) usando el programa IGV. La localización de los sitios de unión de hnRNPF en ésta región final del gen CnAβ fue identificada y validada en la base de datos: <http://rnabind.ucsd.edu/> preparada por los autores que publicaron los datos.

Para el análisis de los datos de Mbnl1 se descargaron los ficheros alineados bed de GSE39911 desde la base de datos de Gene Expression Omnibus (GEO) y alineados contra el genoma de ratón (mm9) usando el programa IGV. La localización de los sitios de unión de Mbnl1 en la región C-terminal de CnAβ

(gen Ppp3cb) fue identificada en las muestras de la línea celular de mioblastos murinos C2C12 y en las muestras de corazón, músculo y cerebro de ratones C57Bl/6. Para el análisis de los datos de RNA-Seq nos descargamos del servidor del NCBI los datos de la señal sin procesar (raw) correspondientes al estudio SRP014709 de los tejidos de corazón, músculo y cerebro de 5 ratones control y 1 muestra de células C2C12. Los ficheros fueron transformados al formato FASTQ usando el software fastq-dump del SRA Toolkit (versión 2.3.3-2). Las lecturas fueron alineadas con el programa TopHat2 (versión 2.012) contra el genoma de ratón GRCm38 usando las anotaciones de Ensembl. Los fragmentos de lectura que mapeaban la región del genoma que codifica para los últimos 4 exones de CnA β (Ppp3cb; cromosoma 14: 20,499,364-20,509,500 codificado en la hebra reversa o complementaria), fueron seleccionados y alineados en un archivo BAM. Los datos fueron normalizados con el valor máximo en cada región y expresados en una gráfica en base a la distribución relativa de las lecturas.

Análisis de MicroArrays

Las células pluripotentes fueron transfectadas con los RNA de interferencia contra CnA β 1 y con un RNA de interferencia control contra el gen de la Luciferasa y fueron analizadas a las 48 horas en condiciones de pluripotencia o diferenciación. Se realizó el análisis de 8 de las 9 muestras generadas (3 controles, 3 con el siRNA CnA β 1 (1) y 2 con el siRNA CnA β 1 (2)). Las muestras de la condición pluripotente fueron marcadas e hibridadas en el Array de Affymetrix Gene 1.0 st Arrays (mouse). Las muestras de la condición diferenciada a mesodermo fueron marcadas e hibridadas en el Array de Agilent Technologies Whole Mouse Genome Microarray 4x44K v2 (G4846A, Agilent Technologies). Este proceso fue realizado en la Unidad de Genómica del CNIC. El análisis y normalización de los datos fue realizado con el software GeneSpring. El análisis de Gene Ontology (GO) fue realizado usando el recurso libre de David Bioinformatics. Se consideraron significativos los resultados de GO con un valor menor de $p < 0.05$. Los datos completos de los microarrays han sido suministrados a la base de datos pública Gene Expression Omnibus (GEO) con el código GSE72103.

Los datos usados para el análisis de la expresión de CnA β 1 y CnA β 2 en células hematopoyéticas se obtuvieron de los valores normalizados obtenidos del servidor GEO con los códigos GDS2398 y GDS2718. La expresión de CnA β 1 se corresponde con el código de array 1433835_at que presenta una única lectura específica de ésta isoforma, mientras que para CnA β 2 se usó 148473_at, que reconoce el último exón de ésta isoforma.

Análisis de proliferación celular

Las células embrionarias fueron transfectadas y diferenciadas a mesodermo en cuerpos embrionarios. A las 48 horas de la diferenciación se recogieron las células y se cultivaron con BrdU durante 4 horas en medio de diferenciación en placas Petri no adherentes. Los cuerpos embrionarios se recogieron en grupos de tres y se colocaron en placas de p24, donde fueron centrifugados a 2000 rpm. Posteriormente las células se fijaron y permeabilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de BrdU se dejaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Para la cuantificación se realizó un ensayo colorimétrico por la enzima HRP unida al anticuerpo secundario y se cuantificó la absorbancia a 450 nm y 550 nm en un espectrofotómetro. Como control negativo se usaron cuerpos embrionarios, del grupo control, no tratados con BrdU y pocillos sin células tratados con la solución de BrdU.

Western Blot

Los cuerpos embrionarios y los tejidos de ratón fueron homogeneizados en buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, y 50 mM Tris pH 8.0) en presencia de EDTA e inhibidores de proteasas (04693159001 y 04906845001 Roche Diagnostics). Los lisados de proteína fueron separados en geles de SDS-PAGE y transferidos a membranas de PVDF. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas de los anticuerpos se usó una solución de leche desnatada en polvo diluida al 3% en TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl), donde se incubaban las membranas 30 minutos. El anticuerpo primario se incubó toda la noche en TBS (1X), y posteriormente se

lavó 5 minutos en TBS (1X) y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con HRP (anti-mouse P0447 y anti-rabbit P0448, Dako). Los anticuerpos secundarios se lavaron 3 veces en TBST (TBS 1X, 0.1% Tween 20) con un tiempo de lavados entre 5-15 minutos por lavado. Los anticuerpos que reconocen formas fosforiladas de la proteína requirieron tiempos cortos para verse mejor, frente a los anticuerpos totales donde tiempos de lavado mayores favorecieron una mejor resolución al quedar más limpios. Los anticuerpos primarios usados fueron: AKT (4691 Cell Signaling), p-AKT S473 (4058 Cell Signaling), GSK3 β (9315 Cell Signaling), p-GSK3 β (9323 Cell Signaling), β -actin (A5316 Sigma), β -catenin (9562 Cell Signaling), Cog8 (PA5-29126, Thermo), Vinculin (V4505, Sigma), p-SMAD2 S465/467 (3108 Cell Singaling), SMAD2 (5339 Cell Signaling). La intensidad y el contraste de las membranas escaneadas fueron ajustados linealmente en Adobe Photoshop CS5.

Co-inmunoprecipitación

Las células se lisaron en la solución de lisis: 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, 0.5% NP40, 10% Glicerol, junto a los inhibidores de proteasas y fosfatasas (04693159001 y 04906845001 Roche Diagnostics). Se dejaron con la solución de lisis 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se incubó con unas bolas de proteína G para eliminar posibles uniones inespecíficas. Posteriormente se añadió al sobrenadante unas bolas de proteína G preparadas con el anticuerpo (Anti-GFP living colors proveniente del suero de conejos – Clontech), y se dejó toda la noche rotando en una noria a 4°C para favorecer la interacción con el anticuerpo. Al día siguiente se realizó el análisis de las muestras en un gel de proteínas. Se analizó la presencia de mTOR y Cog8 usando los anticuerpos anti-mTOR (2972, Cell Signaling) y anti-Cog8 (PA5-29126, Thermo).

Ensayo de Luciferasa

Las células embrionarias fueron lisadas en la solución de lisis suministrada por el fabricante (E1980 Promega) y homogeneizadas durante 15 minutos a tempe-

ratura ambiente. Para el análisis de la actividad de la Luciferasa se añadió el sustrato sobre el homogeneizado y se analizó su fluorescencia a 560 nm.

En el caso de los análisis de la actividad de β -catenina se usó un plásmido con varios sitios de unión para el factor de transcripción TCF en el promotor seguido del gen reportero Luciferasa (TOP-Luc), y como control se usó un plásmido con estos sitios mutados (FOP-Luc). Este factor de transcripción es activado por β -catenina y sirve para medir la actividad de esta vía de señalización. Por otro lado, para el análisis de la actividad de NFAT se usó un plásmido con 9 sitios de unión para este factor de transcripción en el promotor, seguido de la Luciferasa. Este plásmido fue facilitado por el laboratorio de Jeffrey D. Molken-
tin.

El análisis de la actividad de Luciferasa en los corazones se realizó lisando el tejido en el buffer de lisis durante 15 minutos. La actividad de Luciferasa se midió como se ha indicado anteriormente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos obtenidos fueron normalizados por la concentración de proteína total en cada muestra.

Predicción de la estructura de proteínas

La estructura de CnA β 2 fue predicha usando el software Itaser. Para favorecer el correcto plegado de ésta, se usó como molde PDB la estructura de CnA α (1AUI) de la base de datos de proteínas (Protein Data Bank – PDB), dado que ambas presentan una alta homología de secuencia y función. Esta estrategia fue usada también para la predicción de CnA β 1, a excepción de que en este caso se usó como molde CnA β 2. De los 5 modelos estructurales generados por el software se seleccionó el que más se ajustaba a los siguientes parámetros: que el dominio de calmodulina fuese una α -hélice y, en el caso de CnA β 2, que tuviese el dominio autoinhibidor bloqueando el acceso al sitio catalítico, tal y como se muestra en el PDB de CnA α . Las estructuras de los modelos generados se encuentran adjuntadas en el CD.

Construcciones de DNA

Para el estudio de la localización de CnA β 1 y CnA β 2 se usó el vector pEGFP-C3. Todas las construcciones fueron previamente amplificadas por PCR usando el kit de alta fidelidad HiFi HotStart Ready Mix PCR kit (Kapa Biosystems). Como molde se usaron las construcciones de CnA β 1 y CnA β 2 que se encontraban clonadas en el vector de expresión de pCDNA3.1, y se clonaron en el vector pGEM-T Easy para proceder a su secuenciación. Los clones validados por secuenciación fueron posteriormente clonados en el vector pEGFP-C3, donde quedaron en fase con la GFP. Para el análisis de la localización de CnA β 1 se mutaron los siguientes aminoácidos: ACREFL \rightarrow VSKDLFF. El clonaje de los cDNAs para la producción de RNA modificados se realizó según el protocolo descrito por Pankaj K. Mandal y Derrik Rossi (Pankaj K Mandal & Rossi, 2013). Brevemente, la región codificante de GFP (control negativo), CnA β 1 o CnA β 1-mutada fueron fusionadas a una región 5'UTR que contenía un sitio de unión para la T7 junto a una secuencia Kozak, y a la región 3'UTR de la alfa globina para favorecer unos altos niveles de expresión.

Producción de RNA modificado

La producción y purificación de los RNAs modificados se realizó usando el kit (MegaScript T7 Ambion). Para evitar la activación de la vía de señalización del interferón se incluyeron dos nucleótidos modificados: 5-methyl-CTP y pseudo-UTP (Trilink). Estos nucleótidos producen un cambio en la estructura de la cadena de RNA que evita su detección por parte del sistema del interferón, a la vez que permite su traducción por parte del ribosoma (Karikó et al, 2005; Warren et al, 2010). Así mismo, se añadió un grupo CAP al inicio del transcrito durante el proceso de transcripción in vitro, no obstante ha sido descrito que este proceso sólo es eficiente aproximadamente en un 60% de las moléculas, por lo que los transcritos producidos requerían ser desfosforilados tras su purificación. La desfosforilación de los RNA se realizó a 37°C durante 30 minutos en un bloque térmico usando fosfatasa alcalina (M0289S NEB). Tras la desfosforilación los transcritos fueron purificados.

Inmunofluorescencias

Las células P19 fueron transfectadas con las diferentes versiones de las construcciones GFP y crecidas durante la noche sobre cristales recubiertos con 1% de gelatina para favorecer la adhesión celular. Las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 10 minutos a 4°C, fueron lavadas en PBS 3 veces durante 5 minutos en agitación suave, permeabilizadas 10 minutos con Triton X-100/PBS durante 10 minutos e incubadas en una solución de bloqueo que contenía suero de cabra al 10%, diluido en PBS, durante 30 minutos. Las células se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios durante la noche a 4°C en solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios usados fueron: anti-GFP (632592, Clontech (conejo) o 1010/0511FP12, Aves lab (pollo)), anti-GM130 (610823, BD Bioscience) o anti-Cog8 (PA5-29126, Thermo). Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces en PBS en agitación suave durante 5 minutos e incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios. Para el montaje las células se tiñeron con DAPI para la detección del núcleo y se añadió medio de montaje Vectashield.

Ensayo de doble híbrido en levadura

El ensayo de doble híbrido en levadura se realizó usando el kit GAL4 Two-hybrid phagemid vector kit (Stratagene). Este ensayo se llevó a cabo para la detección de nuevas interacciones de CnA β 1 en una librería de cDNA preparada a partir de cardiomiocitos neonatales de rata. La región codificante de CnA β 1 se clonó en el vector pBD-GAL4 y se verificó por secuenciación y western blot. La librería de proteínas diana se preparó clonando los cDNA en el vector pAD-GAL4-2.1. Para el estudio de la interacción de CnA β 1 se co-expresaron el plásmido pBD-GAL4-CnA β 1 junto a uno de los plásmidos de la librería de cDNA en levaduras (línea YRG-2). La identificación de proteínas que interaccionan con CnA β 1 se realizó por la detección de la transcripción de los genes reporteros HIS3 y LacZ. El gen HIS3 permite la producción de histidina y el crecimiento de las colonias usando un medio condicionado sin histidina. Por otro lado, el gen LacZ permite la selección de positivos al transformar el sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en 5-bromo-4-cloro-3-

hidroxindol, que espontáneamente dimeriza y oxida en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo que es un compuesto insoluble de color azul. El gen LacZ y HIS3 se expresan cuando se produce una interacción positiva entre CnA β 1 y una de las proteínas candidatas. En el estudio se detectaron un total de 111 clones positivos en base a estos criterios, de los cuales, tras la secuenciación, se seleccionaron 62 clones que contenían una proteína en fase con la proteína GAL4 (Tabla Suplementaria 3).

Ratones

Los ratones CnA β 1 ^{Δ i12} se generaron por la depleción del intrón 12-13, que contiene la región C-terminal específica de CnA β 1, por recombinación homóloga en la línea de células embrionarias R1 (fondo genético 129). Para la selección de los clones positivos se introdujo un casete de selección de neomicina (Neo) entre dos sitios LoxP en la región intrónica de los exones 13-14, y cuya orientación se encontraba en la dirección opuesta a la de CnA β . Como regiones de homología se usó la región de DNA genómico adyacente, 9.018 bp para la región 5' y 6.398 bp para la región 3', que comprendían desde el intrón 10 hasta la región de DNA genómico que continúa tras la codificación del exón 14 de CnA β (Fig. 24). Se obtuvieron 3 clones positivos, de los cuales se usaron 2 para la generación de animales quiméricos. Tan solo 1 de los dos clones fue capaz de generar quimeras al microinyectar las células en blastocistos de C57/Bl6. Las quimeras se cruzaron con un ratón C57/Bl6 y sus crías se cruzaron posteriormente con un ratón Sox2-Cre (C57/Bl6) para la eliminación del casete de neomicina. Posteriormente los animales heterocigotos se cruzaron entre ellos para obtener animales control y CnA β 1 ^{Δ i12}. Al ser viables, los animales CnA β 1 ^{Δ i12} se mantuvieron entre cruces homocigotos y los animales control se mantuvieron cruzando animales control provenientes de los cruces iniciales. Todos los experimentos han sido realizados con éstos animales. Actualmente se está homogeneizando el fondo genético de la línea de éstos ratones por cruces de animales heterocigotos con ratones C57Bl/6. Para estar seguros de que todos los cromosomas, incluidos los cromosomas sexuales X e Y, son de C57Bl/6 los cruces se realizan cambiando el sexo del ratón de fondo puro entre los cruces.

Los ratones α MHC-CnA β 1 se generaron por la microinyección de una construcción de DNA que contenía la región codificante de CnA β 1 junto a la región promotora del gen α -MHC (5Kb), cuya expresión está restringida a los cardiomiocitos. La caracterización de estos ratones ha sido previamente realizada (Felkin et al, 2011). Los controles usados para esta línea provienen de los cruces entre ellos.

Los animales NFAT-Luc se generaron por la microinyección de una construcción de DNA que contenía el gen NFAT bajo el control de un promotor mínimo de CMV precedido de 9 sitios de unión para NFAT provenientes del promotor del gen IL-4 (Wilkins et al, 2004). Estos ratones se cruzaron con los ratones α MHC-CnA β 1 y sus correspondientes controles. Todos los animales usados en estos estudios han tenido acceso a agua y comida de forma regular y han sido expuestos a ciclos de 12 h de luz y oscuridad. Los ratones se sacrificaron en una cámara de CO₂. Sólo se han usado machos para todos los estudios.

Para el genotipado se lisaron las colas en 30-40 μ de la solución de lisis (1mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS, 0.5 mg/ml Proteinasa K) durante 2 horas a 55°C. Posteriormente, se pasó 1 μ l de lisado a una solución de inactivación con SDS y NP40 al 0.1%, y de esta solución se usó 1 μ l para la PCR. El genotipado de los ratones CnA $\beta^{\Delta i12}$ se realizó por la combinación del cebador *delantero* con el *CnA β int 12 reverso*, que da los positivos para CnA β 1, y el cebador *delantero* con el *CnA β int 13 reverso*, que da los negativos para CnA β 1 (Tabla 6). Para el genotipado se realizaron 40 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y, 45 segundos a 72°C. El genotipado de los ratones α MHC-CnA β 1 se realizó por una PCR de la región polyA de SV40 incluida en la construcción. Las condiciones usadas fueron: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, realizándose 40 ciclos de amplificación. La secuencia de los cebadores está en la Tabla 6.

La extracción de sangre para las hematologías (aproximadamente 100 μ l) se realizó por la vena mandibular de los ratones usando un eppendorf tratado con EDTA y se analizaron posteriormente en un citómetro de flujo Pentra 80.

Citometría de las células hematopoyéticas

Las células hematopoyéticas fueron extraídas del fémur y la tibia de ratones adultos de dos meses de edad. Los huesos fueron triturados en un mortero para extraer las células y resuspendidas en PBS. Para el marcaje, las células se centrifugaron y resuspendieron inicialmente con el coctel de linaje (Tabla 7) para marcar las células diferenciadas (positivas). Posteriormente se marcaron con los anticuerpos que reconocen cada tipo de célula troncal. Para la detección se usaron los siguientes anticuerpos de la Tabla 7, y las células se definieron según el criterio de la Tabla 8.

Cirugías

La inducción de sobrecarga de presión se realizó mediante la ligadura de la aorta, tratando de reproducir la enfermedad humana tanto como fuese posible (Lara-Pezzi et al, 2015). Los ratones fueron anestesiados usando 3-3.5% de sevoflurano administrado con oxígeno al 100%, intubados y mantenidos con ventilación mecánica durante el procedimiento. Para la cirugía se rasuró el pelo de los animales, la piel se desinfectó con etanol y se procedió a la realización de un corte en el tórax que permitiese la visualización de la aorta. Para la constricción de la aorta se usó una sutura no reabsorbible de polifilamento anudado alrededor de la aorta y una aguja roma de 27-gauge. La ligadura se realizó en el callado aórtico entre la arteria carótida y la arteria innominada. Después de realizar la ligadura, la aguja de 27-gauge se retiró dejando la aorta constreñida al diámetro de la aguja. Posteriormente, se procedió a la sutura de las capas musculares y la piel para cerrar el tórax del animal. Todos los animales recibieron una dosis de buprenorfina (0.1 mg/kg) como analgesia durante los días posteriores al procedimiento. Todos los procedimientos se realizaron bajo los principios de cuidado animal formulados por la Sociedad Nacional para la In-

vestigación Médica y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (US National Institutes of Health Publication 85-23, 1996, actualizado en 2011).

Análisis Eco-cardiográfico

Las ecografías transtorácicas fueron realizadas y analizadas de forma ciega por una doctora especialista en imagen cardiaca a 2, 8 y 15 meses en los ratones CnA β 1 ^{Δ 12-13} y 21 días después de la cirugía en los ratones α MHC-CnA β 1. Para el estudio ecográfico se adquirieron imágenes en modo M y en modo bi-dimensional utilizando un ecógrafo de alta resolución con un transductor de 30 Mhz (Vevo 2100, VisualSonics Inc., Canada). Los animales se anestesiaron con isoflurano entre 1-1.5% administrado con oxígeno al 100%, se monitorizó la frecuencia cardiaca y se pusieron en una superficie a 37°C para preservar la temperatura corporal. Durante las ecografías se ajustó el porcentaje de anestesia con el objetivo de obtener una frecuencia cardiaca de 500 \pm 50 latidos por minuto (bpm). Tras las ecografías los animales fueron mantenidos en una caja aislada iluminada con luz roja hasta que se despertaron, para asegurar su correcta recuperación y el mantenimiento de su temperatura corporal.

Análisis histológico

Los órganos analizados por histología fueron fijados en 4% de PFA/PBS por la noche y posteriormente lavados, deshidratados e incluidos en parafina. Para el análisis de la morfología de los órganos se usó una tinción de hematoxilina y eosina, mientras que para el análisis de la presencia de fibrosis se realizó una tinción de tricrómico de Masson. La cuantificación de los niveles de fibrosis intersticial fue realizada en dos regiones diferentes de cada corazón a una magnificación de 20X con el software ImageJ. La fibrosis perivascular se cuantificó en dos regiones diferentes por corazón a una magnificación de 40X y se normalizó por el diámetro del vaso para cada sección.

Análisis estadístico

Todos los datos han sido presentados como la media \pm SEM según se indica en la leyenda de las figuras. Para el análisis estadístico de los datos se usaron: T-Test para los grupos de dos condiciones a un tiempo, ANOVA de 1 vía seguido del post-test de Dunnet para grupos mayores a dos condiciones a un tiempo, y ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni para análisis de múltiples condiciones y dos variables (GraphPadPrism), como se indica en la leyenda de las figuras. Los cambios se consideraron significativos a partir de $p < 0.05$.

Tabla 1. Secuencia de los RNA de interferencia para el control, CnAβ1 y CnAβ2.

Nombre	Secuencia del siRNA
Control (Lucifera-se)	UUCAUUUAUAAAUCUCGUUCGCGGGC
CnAβ1 (1)	AGUUCCUGUCUUAGCAGCUGACAUA
CnAβ1 (2)	GGUGUUUGUCAACGUUCUAUGUAU
CnAβ2 (1)	GGAGGAUAUCUACACCUCCAUUUUAU
CnAβ2 (2)	UGCUGCUGGCUUUGUAUCAUCUUUA

Tabla 2. Código de los RNA de interferencia contra Cog8 de Invitrogen.

Nombre	Código del siRNA
Cog8 (1)	MSS235216
Cog8 (2)	MSS294762

Tabla 3. Secuencia de los morpholinos.

Nombre	Secuencia
CnAβ Ex12 U1	CATAACATCATTACCACTTTGCAAG
CnAβ Intron12 U1	CTCTAATCATTTACCAGGGTACAAA
CnAβ Ex13 U2	GTACAGAAGTGAGCAGAGGCAT

Tabla 4. Sondas TaqMan usadas para la qRT-PCR.

Gen	Código TaqMan (Applied Biosystems)
Oct3/4	Mm00658129_gH
Sox2	Mm00488369_s1
Gapdh	4352339E
18S	4319413E
Col1a1	Mm00801666_g1
Lox	Mm00495386_m1
RCAN1	Mm01213407_m1
RCAN1.1	Mm00517094_m1
RCAN1.4	Mm00627762_m1

Tabla 5 . Secuencia de los cebadores de SyberGreen usados para la qRT-PCR.

Gen	Cebador delantero	Cebador reverso
Brachyury	CTCCAACCTATGCGGACAAT	CCCCTTCATACATCGGAGAA
Eomes	TTCACCTTCTCAGAGACACAGTTCAT	GAGTTAACCTGTCATTTTCTGAAGCC
Goosecoid	ACGAGGGCCCCGGTTCTGTA	CACTTCTCGGCGTTTTCTGACTCC
Sox17	GCGGCGCAAGCAGGTGAAG	GGGGCCCATGTGCGGAGAC
CnAβ1	ATGCTGTTTCCTTCCTCTGC	GACTGAACCAAGTGCAGCAA
CnAβ2	CTGAACACCGCACATACCAC	CACGGATCTCAGAAAGCACA
CnAβ Ex2-3	ATGGGATACCCAGGGTTGAT	GCAGGTGATCCTCCTACTTCA
Wnt3	CAGCGTAGCAGAAGGTGTGA	TGGCCCCCTTATGATGTGAGT
Mesp1	TGTACGCAGAAACAGCATCC	TTGTCCCCTCCACTCTTCAG
Nestin	CGGAGAGGGAGCAGCACCAA	GGCCTCCCCCACAGCATCCT
Mbnl1	TGCTCCAGAGAGAACTGCAA	TAAAGGCTGCTGATGCACTG
Mbnl2	GCCAGGTTGAAAATGGAAGA	GGCGTTCCTGGAAACATAAA
CnAβ Ex11-14	CAGCCCGGAAAGAAATCATA	CAGTGGTATGTGCGGTGTTC
Acta 1	CATCCGTAAAGACCTCTATGCC	CATCCGTAAAGACCTCTATGCC
BNP	GCCAGTCTCCAGAGCAATTC	TCTTTTGTGAGGCCTTGGTC

Tabla 6: Cebadores para genotipar los ratones CnAβ^{Δ12} y los ratones αMHC-CnAβ1.

Nombre	Secuencia
CnAβ int 11 (delantero)	TGAAATTTTGGGGATCAAGC
CnAβ int 12 (reverso)	TCCCTGCATGCATTATGTGT
CnAβ into 13 (reverso)	AGGCATAAGACACACCCACA
SV40 FW (αMHC-CnAβ1)	GATCTTTGTGAAGGAACCTTAC
SV40 RV (αMHC-CnAβ1)	ATTCCACCACTGCTCCCATTC

Tabla 7. Anticuerpos para la detección de células troncales hematopoyéticas. Los anticuerpos usados reconocen proteínas de membrana expresadas por una o múltiples poblaciones celulares y sirven para la detección por citometría de los diferentes linajes.

Anticuerpo	Conjugado con:	Clon:	Compañía
cKIT	PerCP-Cy5.5	2B8	Biolegend
Sca-1	PE-Cy7	D7	BD Pharmin-gen
CD34	FITC	RAM34	BD Pharmin-gen
CD135	APC	A2F10.1	BD Pharmin-gen
CD16/32	AF 700	93	eBioscience
CD127	PE	A7R34	eBioscience
Biotin Lin. co-cktail	Mix: CD3; B220; F480; Ter119; Ly6G		BD Pharmin-gen

Tabla 8. Definición de cada población celular. Las células troncales de cada linaje se definieron según los anticuerpos indicados en el apartado del inmunofenotipo, donde "+" significa positivo, "-" negativo. Las células troncales LSK indican que son Linaje (Lin) negativas, cKIT y Sca1 positivas y se encuentran subdivididas en tres poblaciones: células troncales de tiempo largo (LT-HSC), de tiempo corto (ST-HSC) y células troncales multipotentes (MPP), donde cada una posee un estado un poco más diferenciado (LT<ST<MPP). Las células troncales mieloides y linfoides se definieron en base a la presencia de cKIT, Sca1 y CD127.

Tipo celular		Inmunofenotipo
LSK (Lin-kit+Sca1+)	LT-HSC	Lin ⁻ cKIT ⁺ Sca1 ⁺ CD135 ⁻ CD34 ⁻
	ST-HSC	Lin ⁻ cKIT ⁺ Sca1 ⁺ CD135 ⁻ CD34 ^{bajo}
	MPP	Lin ⁻ cKIT ⁺ Sca1 ⁺ CD135 ⁺ CD34 ^{bajo}
Células troncales mieloides		Lin ⁻ cKIT ⁺ Sca1 ⁻
Células troncales linfoides		Lin ⁻ cKIT ^{bajo} , Sca1 ^{bajo} , CD127 ⁺

4

RESULTADOS

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CnA β 1 EN CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS

CnA β 1 está enriquecida en células troncales embrionarias

Para el estudio de la función de CnA β 1 primero se analizó su expresión y la de CnA β 2 en cerebro, músculo, hígado, corazón, riñón y pulmón los días 1 y 7 tras el parto (P1, P7) y a dos meses de edad en ratones CD1 y se comparó con células troncales embrionarias de ratón (mouse embryonic stem cells – mESC) en cultivo, (Fig. 6 A, B). La expresión de CnA β 1 se encontró disminuida a dos meses en todos los órganos, a excepción del pulmón, teniendo en algunos casos un pico de expresión a P1 (Fig. 6 A). Por otro lado, la expresión de CnA β 2 presentó un patrón de expresión más heterogéneo, estando aumentada en cerebro y músculo, o inhibida en hígado y riñón, y sin cambios muy significativos en corazón y pulmón a dos meses de edad, respecto a las células embrionarias (Fig. 6 B). Estos resultados sugieren una posible función de CnA β 1 en células embrionarias o durante la diferenciación, mientras que CnA β 2 podría tener una función más importante en cerebro, músculo y corazón adultos.

CnA β 1 es necesaria para la diferenciación a mesodermo

Teniendo en cuenta los altos niveles de expresión de CnA β 1 en mESC comparados con los tejidos adultos, se decidió estudiar sus niveles de expresión usando un protocolo de diferenciación a mesodermo y otro a ectodermo. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de expresión de CnA β 1 durante la diferenciación a mesodermo temprano, mientras que este patrón no se observó en la diferenciación a ectodermo (Fig. 7 A, B). Por otro lado, la isoforma CnA β 2 se induce en ambos protocolos de diferenciación (Fig. 7 C, D).

Resultados

Basándonos en estos resultados, decidimos centrarnos en el estudio de la función de CnAβ1 en las mESC en condiciones pluripotentes y durante la diferenciación a mesodermo. Para ello, las mESC se transfectaron con dos

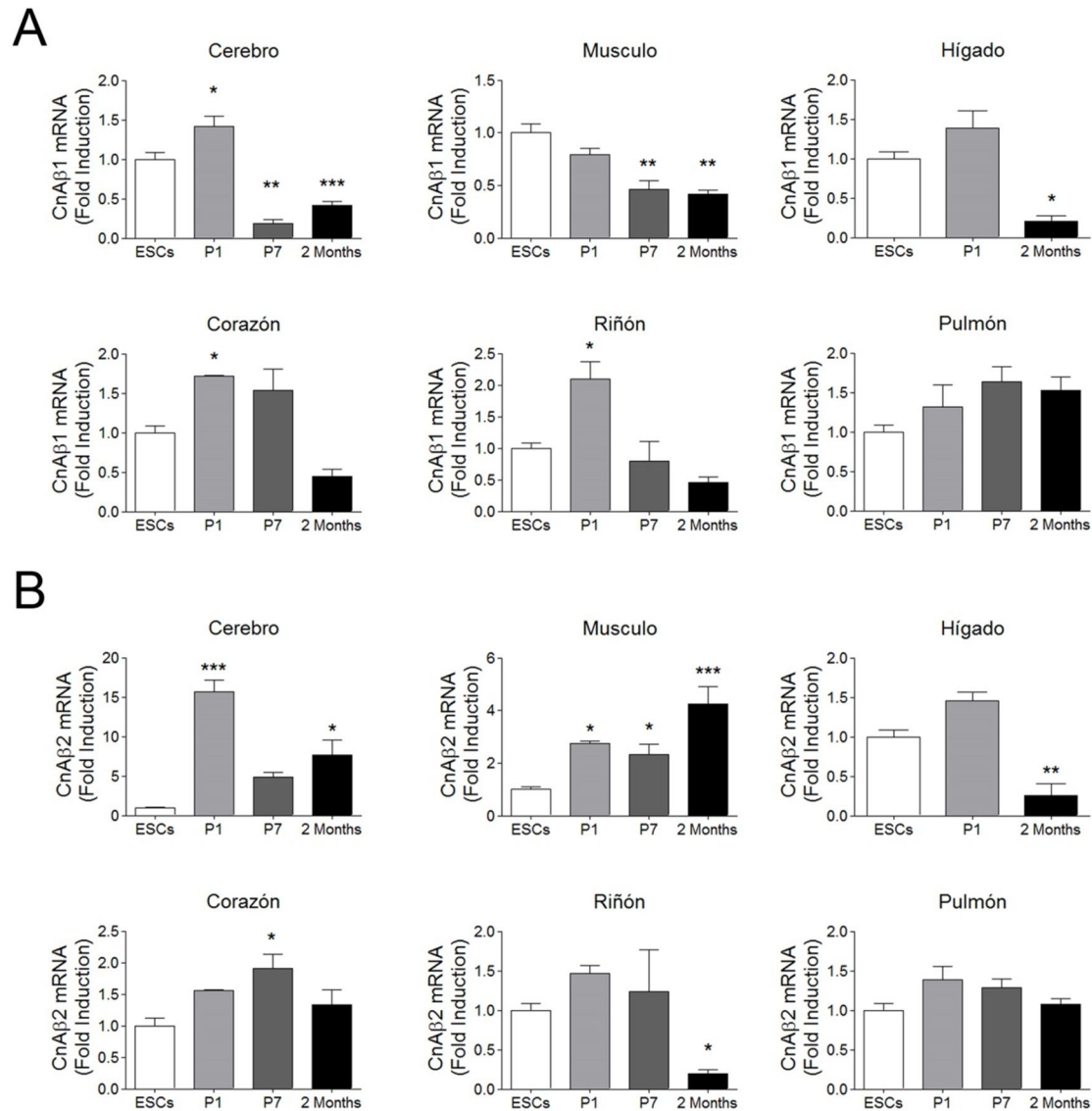


Figura 6. La expresión de CnAβ1 es mayor en células embrionarias que en tejidos adultos. A-B, Comparación de la expresión de CnAβ1 y CnAβ2 en células embrionarias de ratón y en cerebro, músculo, hígado, corazón, riñón y pulmón a días 1, 7 y dos meses post parto aislados de ratones CD1. Los datos están expresados como veces de inducción ("Fold Induction") sobre los valores de las células embrionarias. Para normalizar se usó 18S. Los datos muestran la media de los valores \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía con post test de Bonferroni ($n=3$).

RNA de interferencia de doble cadena (small interference RNA – siRNA) diseñados contra la región específica de CnAβ1 para disminuir sus niveles de expresión. Los resultados obtenidos mostraron una bajada significativa de CnAβ1

en mESC en condiciones pluripotentes, pero no de CnA β 2, demostrando la especificidad de los RNA de interferencia por esta isoforma (Fig. 8 A, B). El perfil transcripcional de estas células fue analizado por microarrays para estudiar la posible implicación de CnA β 1 en el mantenimiento de la pluripotencia. Como puede observarse en la Tabla Suplementaria 1, los datos obtenidos no sugirieron que CnA β 1 pudiera tener un papel relevante en el mantenimiento de este proceso. Estos datos fueron corroborados por una PCR cuantitativa a tiempo real (Quantitative Real Time PCR - qRT-PCR) de los genes de pluripotencia (Fig. 8 C, D).

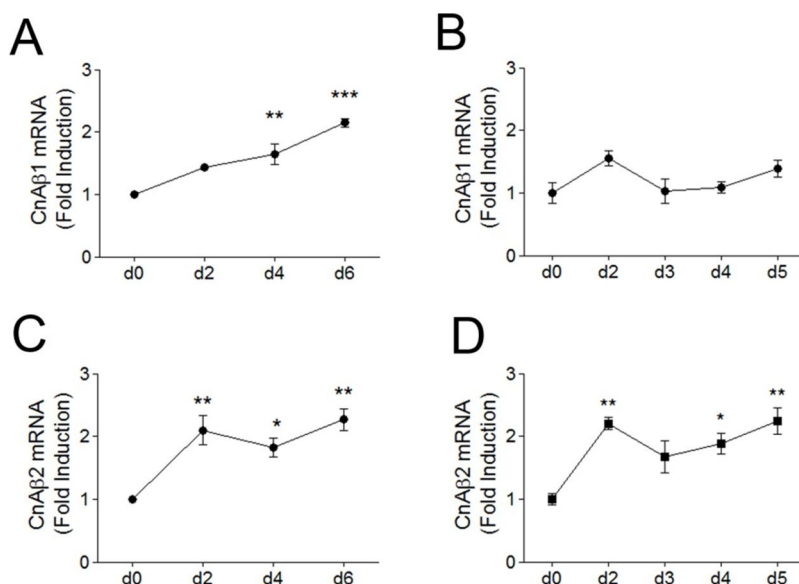


Figura 7. La expresión de CnA β 1 se induce durante la diferenciación a mesodermo. A-D, Expresión de CnA β 1 (A, B) y CnA β 2 (C, D) en células embrionarias diferenciadas a mesodermo (A, C) y ectodermo (B, D) en cuerpos embrionarios durante 6 días, donde el día 0 son las células en condiciones pluripotentes. Los datos muestran la media de la inducción sobre las células

sin diferenciar \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ANOVA de una vía con post-test de Dunnett (n=3).

Posteriormente decidimos analizar la función de CnA β 1 durante la diferenciación a mesodermo. Las células se transfectaron con los RNA de interferencia contra CnA β 1 y se diferenciaron durante 48 horas en cuerpos embrionarios. Tras comprobar que la expresión del gen se había interferido correctamente, se analizó el perfil transcripcional de estas células usando microarrays (Tabla Suplementaria 2). Los resultados mostraron una bajada significativa en los niveles de expresión de diversos genes implicados en la diferenciación a mesodermo, incluyendo Goosecoid (Gsc), Eomes, Sox17, Fgf8, Gata6, Sox7, Brachyury T (BraT), Foxa2 (Fig. 9).

Resultados

Con el fin de estudiar más en profundidad este proceso, diferenciamos las células durante 6 días tras tratarlas con los RNA de interferencia, y analizamos la expresión de los marcadores de diferenciación a mesodermo a días

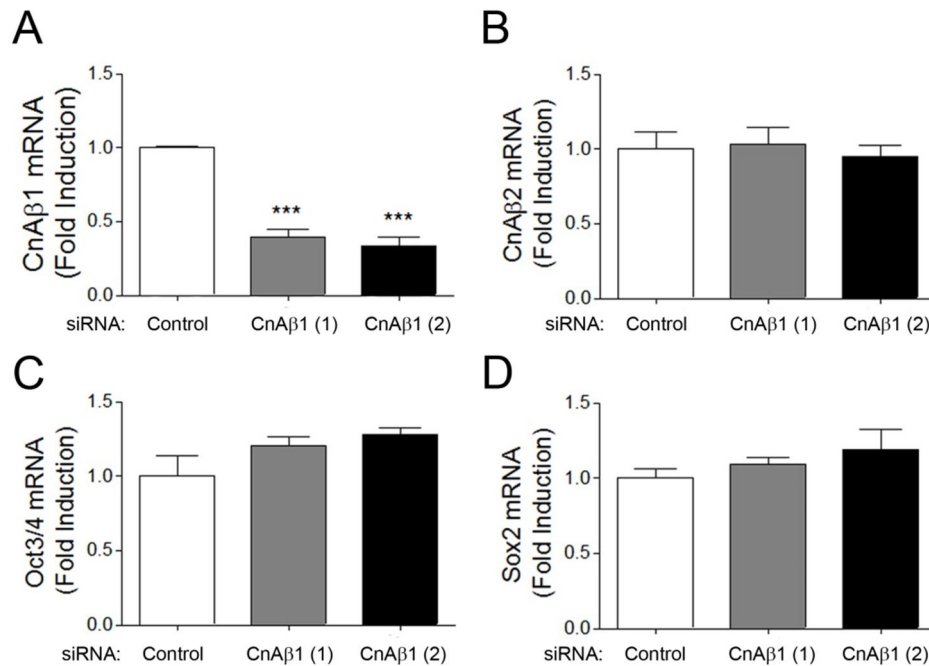


Figura 8. CnAβ1 no es necesaria para el mantenimiento de la pluripotencia. A-B, Análisis por qRT-PCR de la expresión de CnAβ1 y CnAβ2 tras la transfección con dos siRNA contra CnAβ1 y uno control. C-D, Transfección de células embrionarias en condiciones pluripotentes con los RNA de interferencia. Análisis de los marcadores de pluripotencia Oct3/4 y Sox2 a las 48 horas por qRT-PCR. Los resultados están representados como la media de las veces de inducción ("Fold Induction") sobre el control \pm SEM. *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía con post-test de Dunnett ($n=3$).

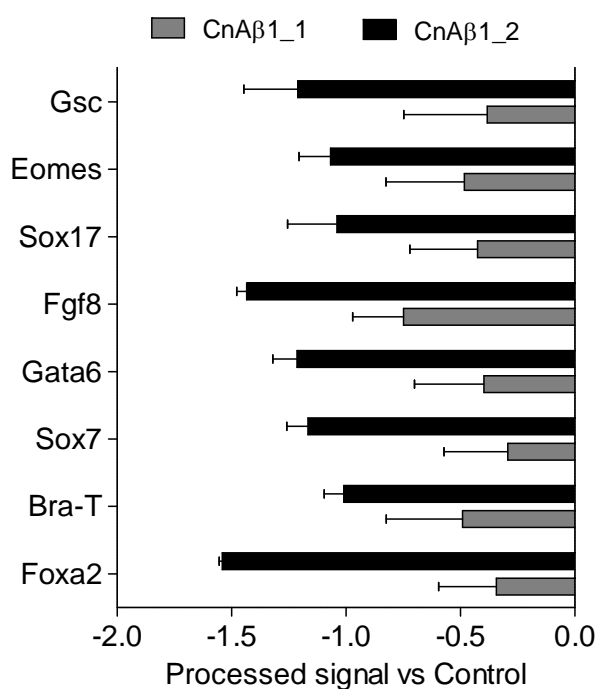


Figura 9. CnAβ1 es necesaria para la diferenciación a mesodermo de las células embrionarias. Datos de expresión normalizados de genes implicados en la diferenciación a mesodermo analizados por microarrays tras la transfección de mESC con dos RNA de interferencia contra CnAβ1 o un siRNA control tras diferenciación a linaje mesodérmico durante 48 horas ($n \geq 2$).

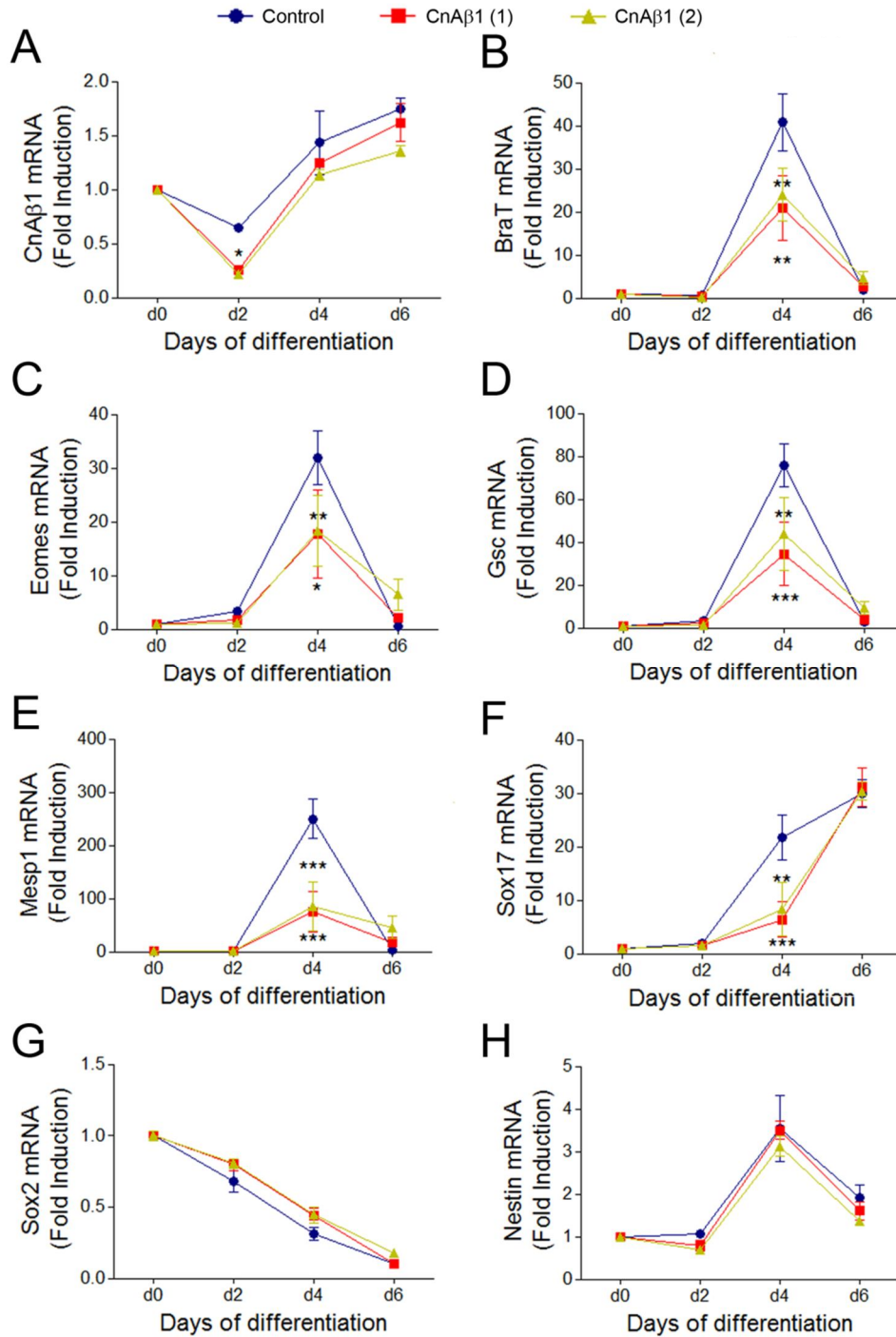


Figura 10. La inhibición de CnAβ1 disminuye la diferenciación a mesodermo. Las células embrionarias fueron transfectadas con dos RNA de interferencia contra CnAβ1 o un siRNA control y diferenciadas durante 6 días a mesodermo usando un protocolo de cuerpos embrionarios. **A-H**, Se extrajo RNA a diferentes días y se analizó la expresión de CnAβ1, BraT, Eomes, Gsc, Mesp1, Sox17, Nestin y Sox2 por qRT-PCR. Los resultados están expresados como la media de las veces de inducción \pm SEM sobre los valores de las células no diferenciadas. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=3).

Resultados

0, 2, 4 y 6, donde el día 0 representa las células cultivadas en condiciones pluripotentes. Los resultados mostraron una disminución en los niveles de expresión de CnA β 1 durante las primeras 48 horas, que se recuperaron a día 4 (Fig. 10 A), probablemente debido a una dilución de los RNA de interferencia asociada a la división celular. Los datos obtenidos por qRT-PCR confirmaron los resultados obtenidos en el microarray a día 2, siendo las diferencias respecto al control mucho más evidentes a día 4, cuando estos genes tienen su pico de expresión (Fig. 10 B-F). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del marcador de pluripotencia Sox2 (Fig. 10 G) así como tampoco en el marcador de diferenciación Nestina (Fig. 10 H), sugiriendo que las células no se están diferenciando más lentamente, ni tampoco a otro linaje, sino que poseen una deficiencia en su capacidad de diferenciación a mesodermo.

Para determinar si durante la inhibición de CnA β 1 se producía una alteración en la capacidad de proliferación celular que pudiese estar mediando este efecto, se analizó la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en las células. Las mESC se transfectaron con los RNA de interferencia y se diferenciaron durante 2 días tras los cuales se incubaron con BrdU durante 4 horas. Los resultados obtenidos no mostraron ninguna diferencia entre los grupos (Fig. 11), sugiriendo que la falta de CnA β 1 en mESC no afecta a la proliferación celular y que los defectos de diferenciación observados no están asociados, al menos en este caso, con una disminución de la proliferación celular.

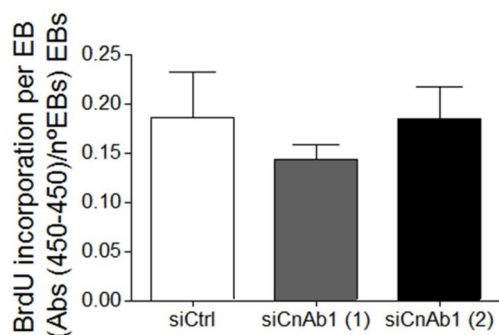


Figura 11. CnA β 1 no inhibe la proliferación de las mESC diferenciadas a mesodermo. La capacidad de proliferación celular tras la inhibición de CnA β 1 fue analizada en mESC diferenciadas a mesodermo en función de su capacidad para incorporar BrdU durante 4 horas el segundo día de diferenciación. Los valores de absorbancia fueron normalizados por el número de cuerpos embrionarios por condición. Los resultados se presentan como la media de la absorbancia \pm SEM. Las diferencias no

fueron estadísticamente significativas tras un test ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (n=6).

CnA β 1 regula la especificación a mesodermo mediada por Akt, GSK3 β y β -catenina.

En relación con la función de CnA β 1, ha sido descrito previamente que CnA β 1 promueve la fosforilación de AKT en la Serina 473 (Lara-Pezzi et al, 2007), la cual es llevada a cabo por el complejo mTORC2. Con el fin de comprender mejor cómo CnA β 1 regula éste proceso analizamos su posible interacción con éste complejo mediante co-inmunoprecipitación. Para ello transfectamos células 293T con unas proteínas quiméricas que expresaban CnA β 1, CnA β 2, o sus regiones C-terminales fusionadas a GFP (Fig. 12 A). Los resultados mostraron que CnA β 1, pero no CnA β 2, interacciona con el complejo MTORC2, y que esta interacción es mediada por su dominio C-terminal (Fig. 12 B). Para investigar si CnA β 1 está controlando esta vía de señalización durante la diferenciación de las mESC se inhibió CnA β 1 con los RNA de interferencia y se diferenciaron las células a mesodermo. Mediante un análisis de western blot se observó una bajada en los niveles de fosforilación de AKT en Ser473 en las muestras tratadas con los RNA de interferencia contra CnA β 1 (Fig. 13 A), lo que indica una menor activación de AKT. Previamente ha sido descrito que AKT regula la diferenciación a mesodermo por la fosforilación, e inhibición, de GSK3 β en Ser9, que a su vez está encargado de unirse y degradar a β -catenina (Naito et al, 2005). Nuestros datos mostraron una reducción en los niveles de fosforilación de GSK3 β tras la inhibición de CnA β 1 (Fig. 13 A), lo que indicaba un aumento en la actividad de GSK3 β y consecuentemente una menor acumulación en los niveles de β -catenina (Fig. 13 A). Con el fin de saber si la disminución en los niveles de β -catenina tenía un efecto en sus dianas se realizó una co-transfección de los RNA de interferencia junto con un plásmido que contiene un multímero para la unión del factor de transcripción TCF, que es activado por β -catenina. Los resultados de este experimento mostraron una bajada significativa en los niveles de activación de TCF tras la inhibición de CnA β 1 a día 2 de diferenciación (Fig. 13 B).

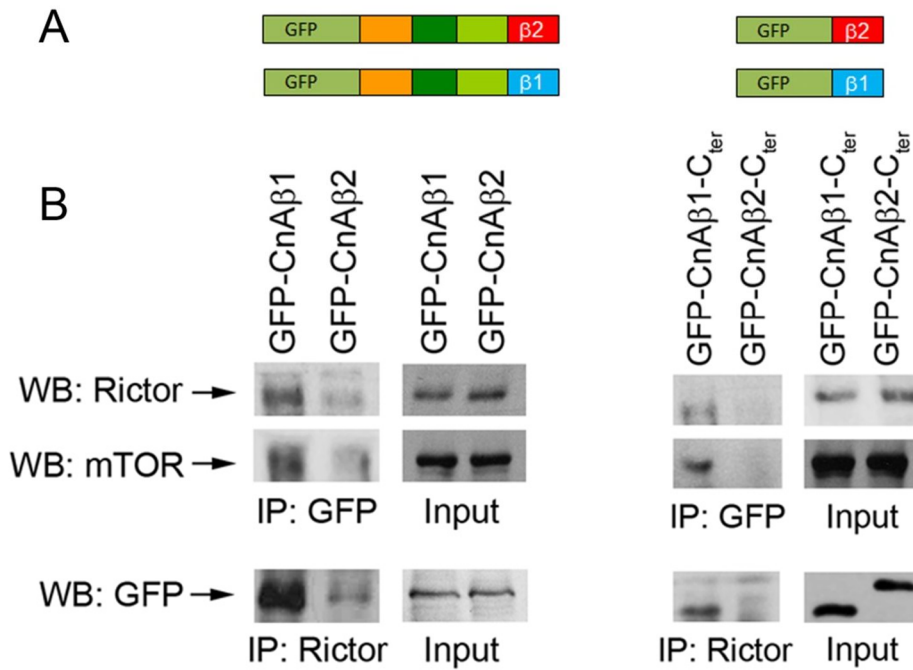


Figura 12. CnA β 1 interacciona con el complejo MTORC2 mediante su dominio C-terminal. **A**, Representación de las construcciones transfectadas en células 293T. **B**, Se transfectaron células 293T con los vectores de expresión GFP-CnA β 1, GFP-CnA β 2, GFP-CnA β 1-C_{ter} y GFP-CnA β 2-C_{ter}. Las células fueron lisadas y se inmunoprecipitaron (IP) con un anticuerpo contra GFP o Rictor. La co-inmunoprecipitación de las proteínas mTOR, Rictor y GFP fue determinada por western blot usando anticuerpos específicos contra estas proteínas. En el lisado total se puede observar una expresión similar de todas las proteínas.

Para determinar la relevancia de la activación de GSK3 β en la pérdida de la diferenciación inducida por los siRNAs de CnA β 1, se inhibió la actividad de GSK3 mediante el uso de LiCl durante 8 horas el segundo día de la diferenciación. Posteriormente, se dejó que las células continuasen con el proceso de diferenciación hasta día 4 sin el inhibidor, y se analizó la expresión de los marcadores de diferenciación a este tiempo. Como se ha observado anteriormente, la inhibición de CnA β 1 causó una bajada significativa de los niveles de expresión de los marcadores de mesoendodermo a día 4 (Fig 13 C). Este efecto era prevenido en las células que fueron tratadas con el inhibidor de GSK3 β (Fig. 13 C). Estos resultados sugieren que CnA β 1 desempeña un papel importante en el proceso de diferenciación a mesoendodermo mediante el control de la vía de señalización AKT/GSK3 β / β -catenina.

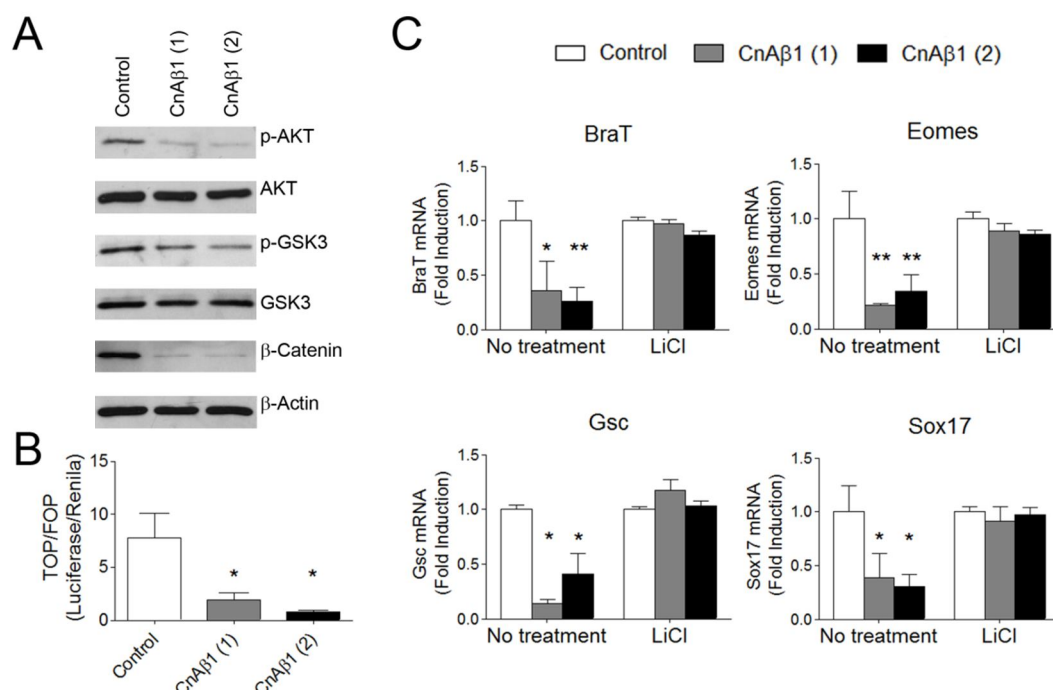


Figura 13. CnAβ1 regula la diferenciación de células embrionarias a mesoendodermo mediante la activación de β-catenina. **A**, Se transfectaron células embrionarias con los RNA de interferencia de CnAβ1 y se analizaron los niveles de p-AKT S473, AKT total, p-GSK3β S9, GSK3β, β-catenina y β-actina por western blot a día 2 de diferenciación. **B**, Las células embrionarias fueron transfectadas como en A junto a un reportero de Luciferasa bajo el control de expresión de un promotor con un multímetro de sitios de unión en tándem para TCF (TOP) o este mismo multímetro con los sitios TCF mutados (FOP). Los resultados están expresados como la media del ratio \pm SEM de TOP/FOP para cada condición. **C**, Las células mESC se transfectaron con los RNA de interferencia contra CnAβ1 y se diferenciaron a mesodermo. Las células se trataron durante 8 horas con 20 mM LiCl a día 2 de diferenciación para inhibir GSK3. La expresión de los marcadores BraT, Eomes, Gsc y Sox17 se analizó a día 4. Los resultados se han expresado como la media de la inducción de la expresión \pm SEM sobre los valores del RNA de interferencia control para cada condición. * $p < 0.05$ ANOVA de una vía con post-test de Dunnett (B), * $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni ($n = 3$) (C).

Para confirmar si el control de la vía de señalización de Akt podía ser regulado por la otra isoforma de CnAβ: CnAβ2, se diseñaron unos RNA de interferencia contra el exón 14 de esta isoforma, que no afectaban a los niveles de expresión de CnAβ1 (Fig. 14 A, B). De forma similar a lo descrito para CnB, la inhibición de CnAβ2 mostró una bajada en los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación a día 4 (Fig. 14 C-H). Sin embargo, en este caso el efecto no estaba mediado por la vía de señalización AKT/GSK3β/β-catenina, dado que no se encontraba alterada tras el tratamiento (Fig. 15).

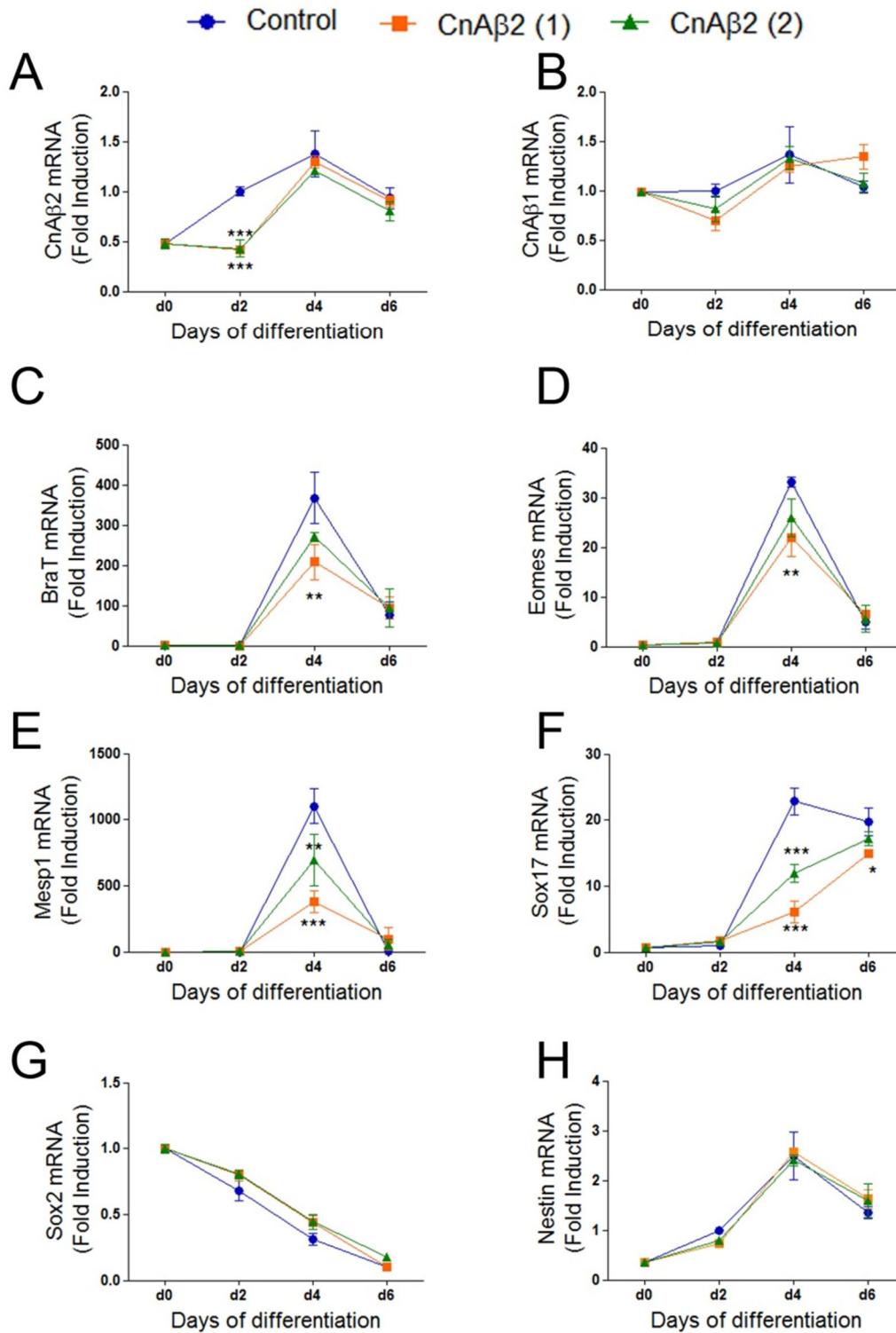


Figura 14. CnAβ2 es necesaria para la diferenciación a mesodermo. Se transfectaron células embriónicas con dos RNA de interferencia contra CnAβ2 y uno control y se diferenciaron a mesodermo durante 6 días. **A-H**, El RNA de las células fue extraído a diferentes tiempos y se analizó la expresión de CnAβ2, CnAβ1, BraT, Eomes, Mesp1, Sox17, Sox2 y Nestina por qRT-PCR. Los resultados están expresados como la media de la inducción \pm SEM sobre los valores de las células no diferenciadas. **p<0.01, ***p<0.001, ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n=3).

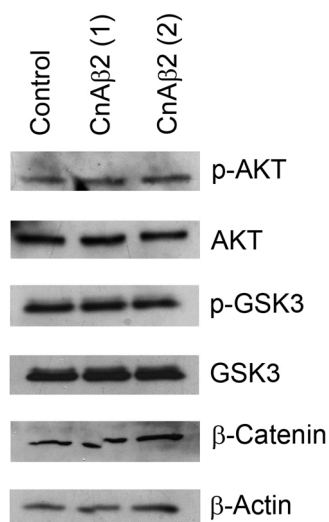


Figura 15. CnAβ2 no controla la vía de señalización de AKT/GSK3β/β-catenina. Se transfectaron células embrionarias con RNA de interferencia contra CnAβ2 o un RNA de interferencia control y se analizaron los niveles de p-AKT S473, AKT total, p-GSK3β S9, GSK3β, β-catenina y β-actina por western blot a día 2 de diferenciación.

La región C-terminal de CnAβ1 dirige su localización al aparato de Golgi

Una de las grandes incógnitas relacionadas con los procesos de splicing y poliadenilación alternativos está relacionada con el desconocimiento del efecto funcional o estructural que estos cambios tienen en la proteína final. Recientemente se han descrito algunos casos en los que el motivo de unión al DNA de un factor de transcripción es sustituido por otro mediante splicing alternativo y cómo este cambio alteraba su función (Gabut et al, 2011; Lu et al, 2014). Con el fin de tener una mejor caracterización de la región C-terminal de CnAβ1, y de cómo ésta influye sobre su función, decidimos generar un modelo estructural.

El cristal con la estructura de su homólogo CnAα ha sido previamente descrito (Ke & Huai, 2003), no obstante la región de unión a calmodulina así como parte del dominio autoinhibidor no se cristalizaron. Recientemente se ha descrito que el dominio de unión a calmodulina se encuentra altamente desorganizado y que solo adquiere su estado estable de α-hélice tras la unión de

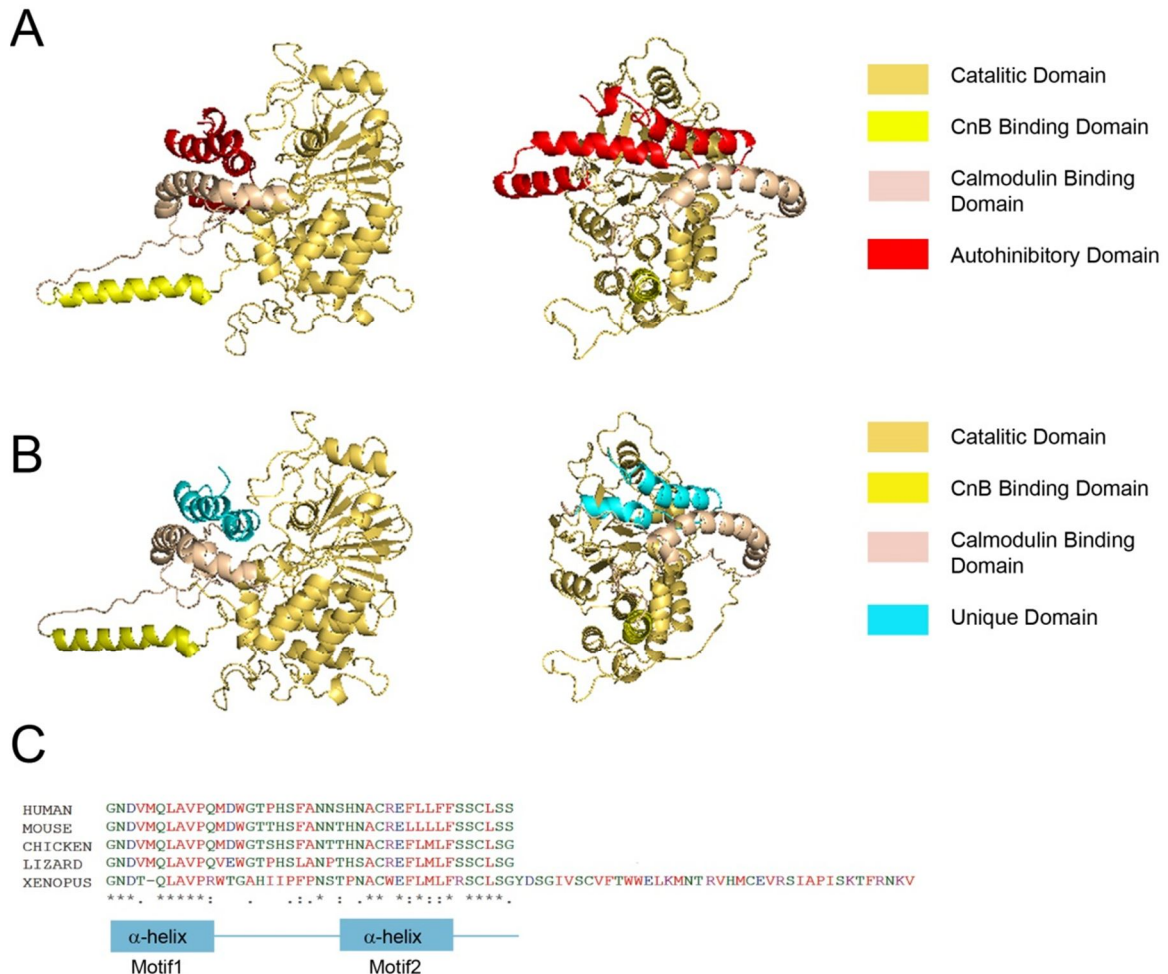


Figura 16. La predicción estructural de CnAβ1 muestra dos α-hélices evolutivamente conservadas.

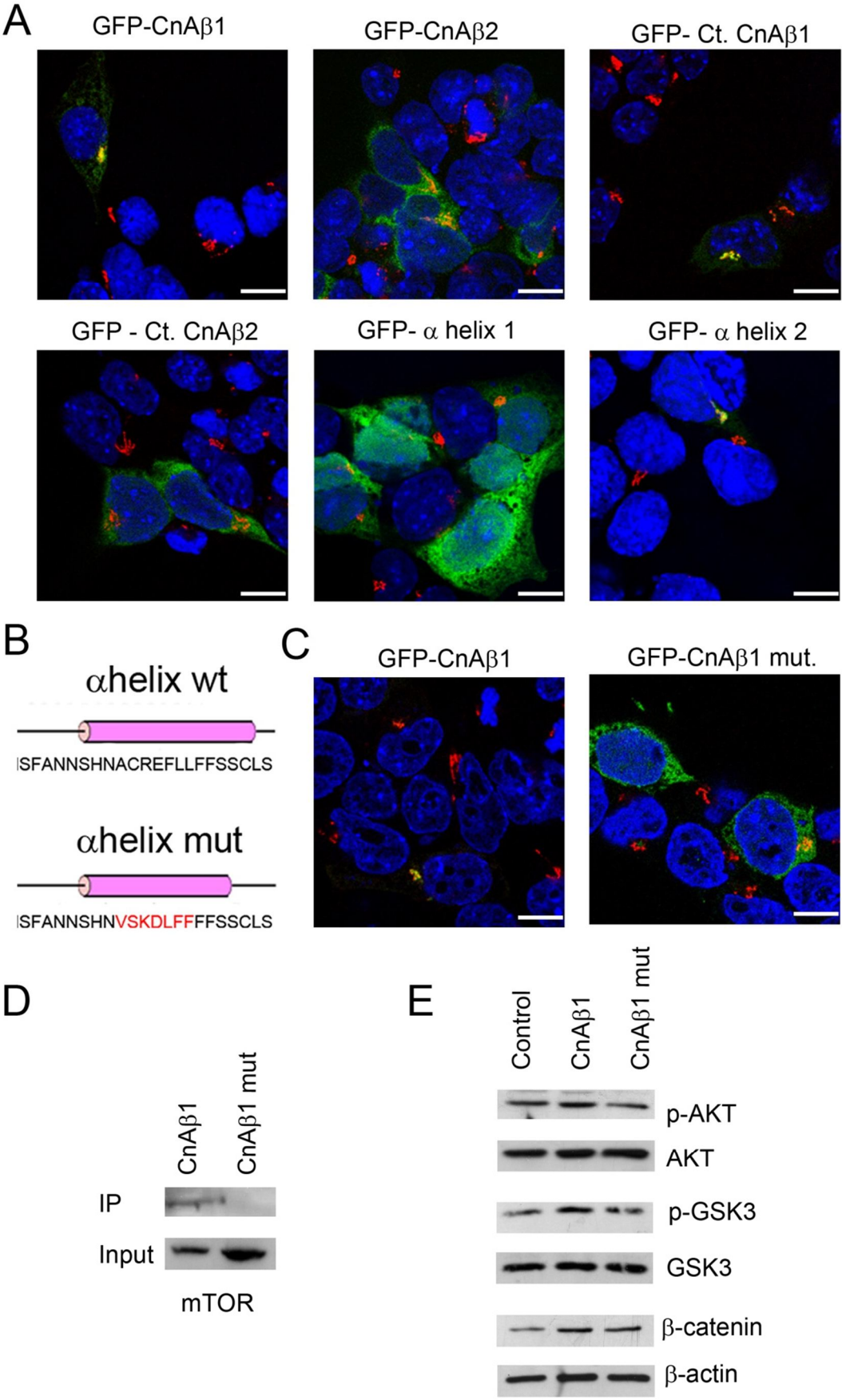
A-B, Predicción estructural de CnAβ2 y CnAβ1 respectivamente, usando el software Itaser. **C**, Análisis de conservación de la secuencia de la región C-terminal de CnAβ1 entre *Xenopus laevis*, *Anolis carolinensis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus* and *Homo sapiens* usando Clustal. Los cuadrados azules muestran las regiones de α-hélice en la estructura (**B**).

calmodulina (Rumi-Masante et al, 2012). Usando esta información predijimos primero la posible estructura de CnAβ2, que posee una mayor homología a CnAα. Como puede observarse, el dominio de calmodulina formaba una α-hélice perfecta rodeada de una gran región poco estructurada que la conectaba con el dominio auto inhibidor que posee 3 α-hélices (Fig. 16 A). Estos resultados están de acuerdo con datos previos donde se describe esta región como altamente desorganizada y podría explicar por qué sólo puede ser estabilizada tras la unión de calmodulina (Rumi-Masante et al, 2012). Para determinar la estructura de CnAβ1 generamos un modelo basándonos en el de CnAβ2. Nuestros resultados mostraron que el domino C-terminal de CnAβ1 se encuentra formado por dos α-hélices (Fig. 16 B). La primera de ellas parece bloquear

el bolsillo catalítico de la enzima, mientras que la segunda parece encontrarse expuesta hacia el exterior. Estos resultados fueron validados por los predictores de estructura secundaria Jpred y Psipred. Curiosamente, las dos α -hélices corresponden a dos regiones altamente conservadas en CnA β 1 (Fig. 16 C) y podrían estar relacionadas con las diferencias encontradas para su función.

Para determinar la función de la región C-terminal y de las dos α -hélices de CnA β 1, se generaron varias quimeras fusionando diversas regiones de CnA β 1 o CnA β 2 a la proteína verde fluorescente (Green Fluorescence Protein - GFP). Estas construcciones se transfectaron en células P19 donde se encontró una localización completamente diferente para CnA β 1 y CnA β en la célula. Por un lado, CnA β 2 se encontraba distribuida de forma homogénea por todo el citoplasma celular mientras que, por el otro, CnA β 1 se encontraba localizada principalmente en el aparato de Golgi (Fig. 17 A), como se puede observar por su colocalización con la proteína de membrana del Golgi 130 (GM130), que se usa como marcador del Golgi (rojo). Esta localización fue reproducida por una construcción que contenía la región C-terminal de CnA β 1, pero no por otra que contenía la región C-terminal de CnA β 2 (Fig. 17 A). Para determinar si esta localización estaba mediada por una de las dos α -hélices del dominio C-terminal de CnA β 1 se clonaron por separado y fusionaron a GFP. Los resultados mostraron que la localización en el aparato de Golgi sólo era mantenida por la construcción que contenía la segunda α -hélice (Fig. 17 A). Estos resultados sustentan la existencia de dos motivos altamente conservados y diferente función en la región C-terminal de CnA β 1.

Con el fin de estudiar si la función de CnA β 1 depende de su localización en el aparato de Golgi, se generó un mutante de CnA β 1 (CnA β 1-mut) en el que se mutaron cinco aminoácidos de la segunda α -hélice de la región C-terminal. Esta secuencia de aminoácidos también se encuentra en una región de mTOR que lo dirige al aparato de Golgi (Xiangyu & X F Steven, 2007). Las mutaciones realizadas trataron de mantener en la medida de lo posible la polaridad y tamaño de los aminoácidos de esta región, y su secuencia fue predicha para mantener la estructura de una α -hélice (Fig. 17 B). La transfección de células P19 con esta construcción mostró un patrón disperso por el citoplasma para la proteína



CnA β 1-mut (Fig. 17 C). Para determinar si la localización de CnA β 1 es importante para su función se analizó por co-inmunoprecipitación su interacción con mTOR, la cual se perdió en el mutante del dominio C-terminal (Fig 17 D). Así mismo, la sobreexpresión en mESC de la forma natural de CnA β 1 mostró una inducción moderada en los niveles de fosforilación de AKT y GSK3 β así como en los niveles totales de β -catenina respecto a unas células transfectadas con GFP como control, que no se observó con la forma mutada (Fig. 17 D).

El dominio C-terminal de CnA β 1 interacciona con Cog8 y es necesario para su función

Para estudiar como CnA β 1 se localiza en el aparato de Golgi se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras. Este ensayo fue llevado a cabo por la Dra. Leanne Felkin en Imperial College London. El ensayo consiste en la generación de proteínas quiméricas unidas a una proteína de unión al DNA y a una proteína activadora de la transcripción (Brückner et al, 2009). El sistema que se usó expresaba el gen reportero HIS3 que permite la selección en medio condicionado sin histidina y el gen LacZ que transforma el sustrato X-gal (5-bromo-4-

Figura 17 (ver página 88). CnA β 1 colocaliza con el aparato de Golgi usando una α -hélice evolutivamente conservada en su dominio C-terminal. **A**, Se transfectaron células P19 con un plásmido que contenía una quimera de la proteína EGFP unida a la proteína CnA β 1 o CnA β 2 completas, la región C-terminal de CnA β 1 o CnA β 2, o a cada una de las hélices alfa de la región C-terminal de CnA β 1. Se analizó la colocalización de cada una de las construcciones con el marcador de Golgi GM130 (rojo) por inmunofluorescencia. Barra, 10 μ m. **B**, Representación esquemática mostrando los aminoácidos mutados en la segunda hélice alfa de CnA β 1 wild type (α helix wt) y CnA β 1-mut (α helix mut). **C**, Las células P19 se transfectaron con una quimera de la proteína EGFP fusionada a la proteína CnA β 1-mut y se analizó su colocación con el marcador de Golgi GM130 (rojo). Barra, 10 μ m. **D**, Se transfectaron células 293T con los vectores de expresión GFP-CnA β 1 o GFP-CnA β 1-mut. Las células fueron lisadas y se inmunoprecipitaron (IP) con un anticuerpo contra GFP. La co-inmunoprecipitación de la proteína mTOR fue determinada por western blot usando un anticuerpo anti-mTOR. En el lisado total se puede observar una expresión similar de mTOR en ambas condiciones como referencia. **E**, Células embrionarias transfectadas con RNA modificados para la expresión de GFP (Control), CnA β 1 y CnA β 1-mut y análisis de los niveles de p-AKT S473, total AKT, p-GSK3 β S9, total GSK3 β , β -catenin y β -actin por western blot a día dos de diferenciación.

Resultados

cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en 5-bromo-4cloro-3-hidroindol, que espontáneamente dimeriza y oxida en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto insoluble de color azul.

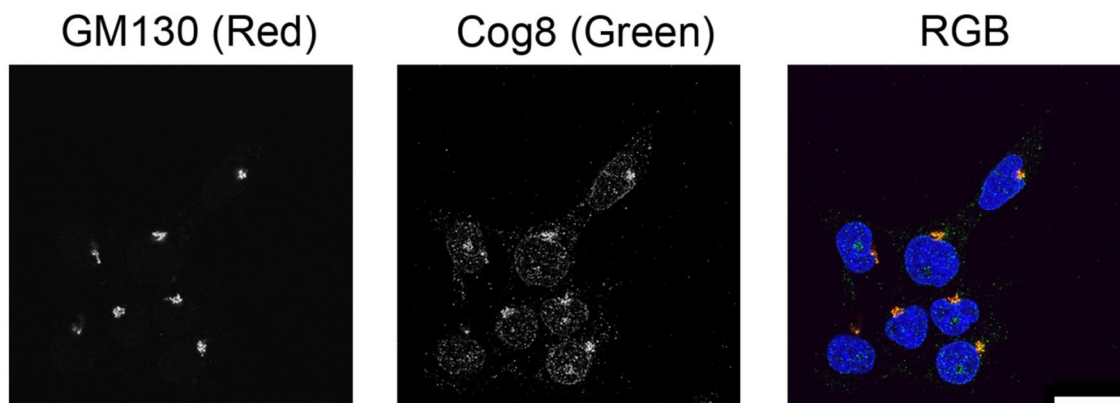


Figura 18. Cog8 colocaliza con el marcador de Golgi GM130. Inmunofluorescencia de Cog8 (verde), GM130 (rojo) y DAPI (azul) en células P19. Los canales rojo y verde se han representado también por separado. Barra, 25 μ m.

Los resultados del ensayo de doble híbrido en levadura mostraron, junto a proteínas cuya interacción con CnA β 1 ya era conocida, como CnB, la interacción con Cog8 (Tabla Suplementaria 3). Cog8 es una proteína externa del Golgi involucrada en la interacción con otras proteínas Cog y el complejo SNARE, que colocaliza con el marcador de Golgi GM130 ((Willett et al, 2013) y Fig. 18). Para validar esta interacción, transfectamos células 293T con las construcciones GFP-CnA β 1 o GFP-CnA β 1-mut y realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación y colocalización. Como puede observarse en la Figura 19 A, Cog8 coprecipitó con la construcción GFP-CnA β 1 pero no con GFP-CnA β 1-mut. Así mismo, la construcción GFP-CnA β 1 mostró una fuerte colocalización con la proteína Cog8 en células P19 (Fig. 19 B). Para determinar si esta localización es necesaria para la localización de CnA β 1 en el aparato de Golgi, se inhibió Cog8 con RNA de interferencia en células P19 y se transfectaron con la construcción GFP-CnA β 1. Los resultados mostraron una deslocalización de GFP-CnA β 1 fuera del aparato de Golgi tras la reducción en los niveles de Cog8 (Fig. 19 C), confirmando que esta interacción es necesaria para la localización subcelular de CnA β 1.

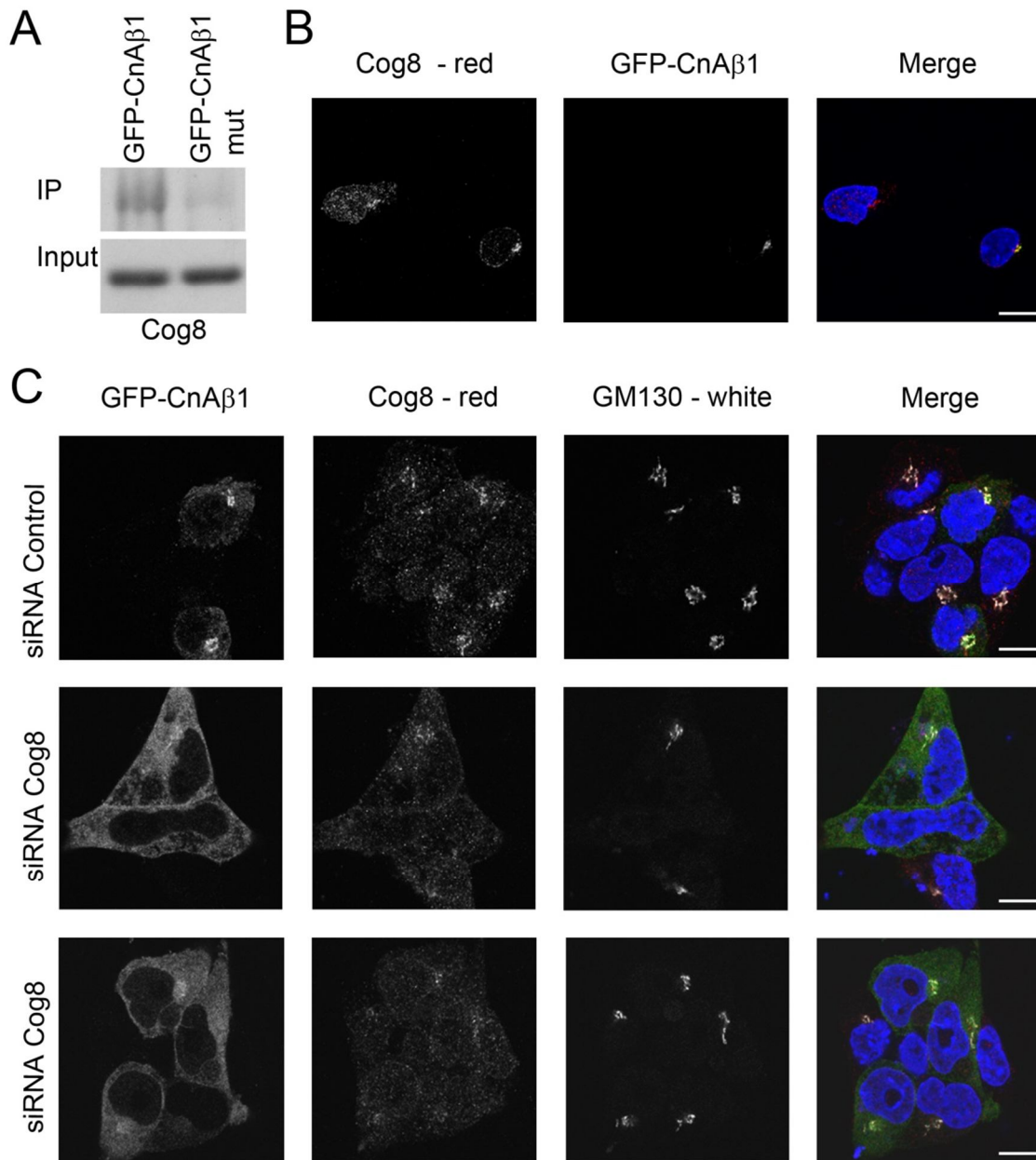


Figura 19. Cog8 interacciona con CnA β 1 y media su localización en el aparato de Golgi. **A**, Se transfectaron células 293T con los vectores de expresión GFP-CnA β 1 o GFP-CnA β 1-mut. Las células fueron lisadas y se inmunoprecipitaron (IP) con un anticuerpo contra GFP. La co-inmunoprecipitación de la proteína Cog8 fue determinada por western blot usando un anticuerpo anti-Cog8. En el lisado total se puede observar una expresión similar de Cog8 en ambas condiciones como referencia. **B**, Las células P19 se transfectaron con un vector de expresión para GFP-CnA β 1. Su colocalización con Cog8 (rojo) se analizó por inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra, 10 μ m. **C**, Las células P19 se transfectaron con RNA de interferencia contra un control o Cog8 junto al plásmido GFP-CnA β 1. La localización de GFP-CnA β 1 (verde), Cog8 (rojo) y GM130 (blanco) se determinó por inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Los canales verde, rojo y blanco también se muestran por separado. Barra, 10 μ m.

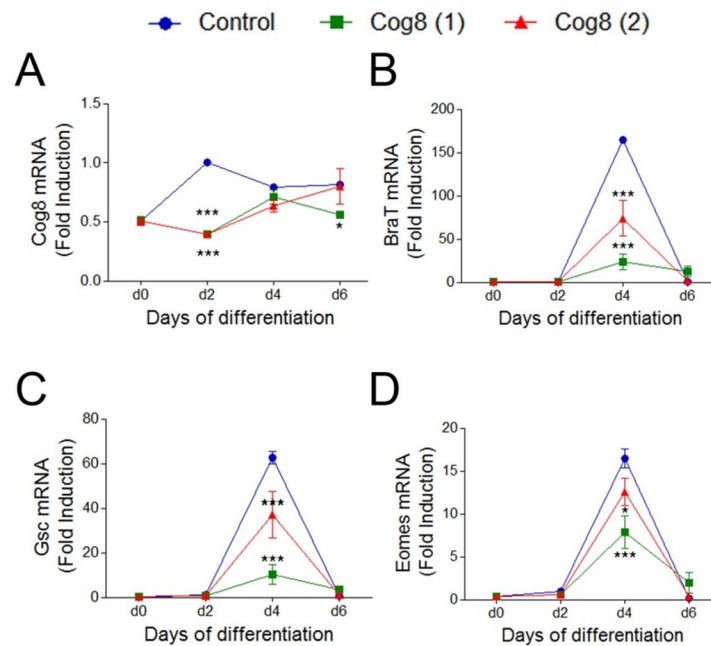


Figura 20. Cog8 es necesaria para la diferenciación a mesodermo de las células embrionarias. Las células embrionarias se transfectaron transitoriamente con dos RNA de interferencia contra Cog8 o un control y se diferenciaron a mesodermo. **A-F**, El RNA de las células fue extraído a varios tiempos y se analizó la expresión de los genes Cog8, BraT, Gsc y Eomes por qRT-PCR. Los resultados se muestran como la media de la de inducción de la expresión \pm SEM sobre los valores de las células no diferenciadas. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni post-test ($n=3$).

Para caracterizar la función que Cog8 podría tener en mESC decidimos inhibir su expresión durante la diferenciación a mesodermo de estas células. Aunque los RNA de interferencia para Cog8 sólo fueron funcionales durante las primeras 48 horas de la diferenciación (Fig. 20 A), a día 4 observamos una bajada significativa de los marcadores de diferenciación a mesodermo (Fig. 20 B-D), al igual que antes se había observado para CnA β 1. Estos resultados demuestran que la región C-terminal de CnA β 1 es la responsable de su función durante la diferenciación de células mESC a mesodermo, mediante su interacción en el Golgi con la proteína Cog8.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CALCINERUINA A BETA 1

La regulación de la expresión de CnAβ1 es independiente de U1

La diferente función de CnAβ1 y CnAβ2 así como su expresión diferencial sugieren que su transcripción está regulada de manera específica. Por otro lado, el análisis de la conservación del dominio C-terminal de CnAβ1 desde anfibios, analizada por BLAST, Clustal y el ECRbrowser, mostraron que la región codificante de CnAβ1 está muy conservada desde el anfibio *Xenopus Tropicalis*, y su secuencia de poliadenilación desde los reptiles *Anolis carolinensis* y *Pelodiscus sinensis* (Tabla 9 y Fig. 21).

Especie	CnAβ1 codificante	CnAβ1 polyA	CnAβ2
<i>Homo sapiens</i>	✓	✓	✓
<i>Mus musculus</i>	✓	✓	✓
<i>Ratus norvegicus</i>	✓	✓	✓
<i>Gallus gallus</i>	✓	✓	✓
<i>Anolis carolinensis</i>	✓	✓	✓
<i>Pelodiscus sinensis</i>	✓	✓	✓
<i>Xenopus tropicalis</i>	✓	x	✓
<i>Takifugu rubripes</i>	x	x	✓

Tabla 9: Conservación de CnAβ1 y CnAβ2 entre mamíferos, aves, anfibios y peces. Los resultados muestran la detección de la región C-terminal codificante de CnAβ1 obtenidas en una búsqueda por BLAST, confirmadas por un análisis Clustal y observadas en el ECRbrowser.

Resultados

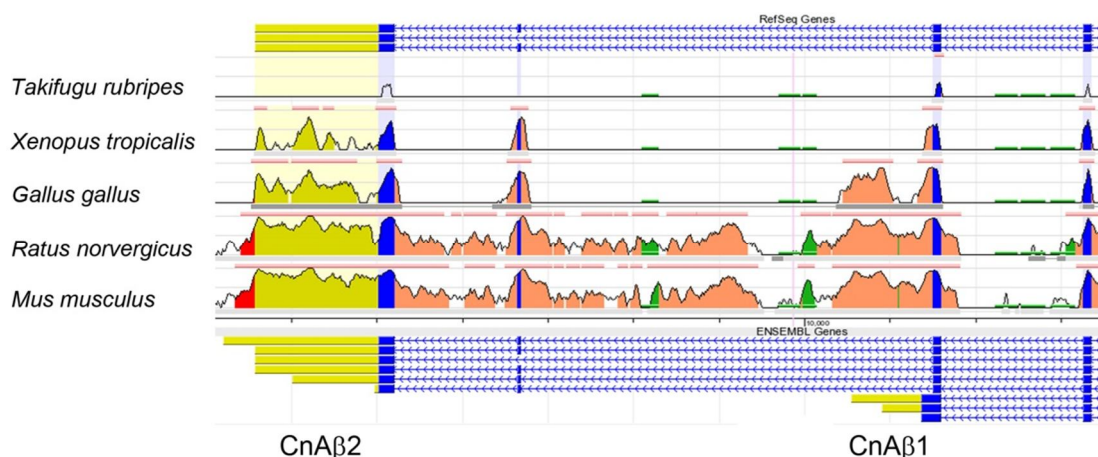


Figura 21: CnAβ1 está conservada desde *Xenopus tropicalis*. Conservación evolutiva mostrada por la base de datos ECRbrowser en la región final del gen ppp3cb (CnAβ) entre los animales Takifugo rubripes, Xenopus tropicalis, Gallus gallus, Ratus Norvergicus y Mus musculus comparados contra el genoma de Homo sapiens.

A lo largo de los últimos años se han descrito diversos mecanismos para la regulación de las isoformas mediante poliadenilación alternativa (Elkon et al, 2013). Estos mecanismos pueden agruparse en los tres siguientes: A, la expresión de factores que regulan la poliadenilación o unión al RNA; B, la cinética de unión de los factores de poliadenilación (dependiente de la velocidad de transcripción); y C, la regulación por la maquinaria de splicing, como la unión de la U1 snRNP (Berg et al, 2012; Vorlová et al, 2011).

Para determinar si la unión de U1 snRNP regula la expresión de CnAβ1, se diseñó un morpholino contra su sitio de unión en el exón 12 del mRNA de CnAβ. Los morpholinos son ácidos nucleicos modificados capaces de unirse al RNA según el principio de complementariedad de bases de Watson y Crik. Originalmente se diseñaron para la inhibición de la traducción por el bloqueo de la unión del ribosoma y se diseñaron contra la región 5' no codificante. En la actualidad también se usan para el bloqueo de la unión de las proteínas y otros factores involucrados en el AS. Contrario a todo lo descrito anteriormente, nuestros resultados no mostraron un cambio en los niveles de expresión de CnAβ1 por qRT-PCR al inhibir la unión de U1 snRNP, pero sí una disminución en los niveles de expresión de los exones 12-13 (Fig. 22 A). Esta bajada de

expresión fue consecuencia de la exclusión del exón 12 del transcrito final, como se observó en una RT-PCR entre los exones 11 a 14 de CnA β 2 (Fig. 22 A).

Recientemente se ha descrito que la unión de U1 snRNP en la región intrónica de los transcritos con isoformas de poliadenilación alternativa, especialmente en aquellas con una región intrónica extensa como la de CnA β 1, promueve su inhibición (Berg et al, 2012). Basándonos en estos datos se determinaron los posibles sitios de unión de U1 en ratón y humano con el software ESEfinder. Los resultados mostraron una posición de potencial unión de U1 muy conservada entre ambas especies. En humanos se predijo la unión de U1 snRNP en la posición 397 del 3' UTR, en la secuencia: AGGTTTTG TAC-CCTGGTAAATGATGCCAAA. En ratón el software predijo su unión en la posición 417 del 3'UTR en la secuencia intrónica: AAATTTTGTAC-CCTGGTAAATGATTAGAGT, quedando ambas muy cerca entre ellas (20 pares de bases de diferencia). En base a estos resultados decidimos generar un morpholino contra la secuencia de humanos que usamos para evaluar si la U1 se estaba uniendo a esta región e inhibiendo la maquinaria de poliadenilación. Los resultados que obtuvimos no mostraron una alteración de los valores de expresión de CnA β 1, los exones 12-13, ni el splicing entre los exones 11-14 (Fig. 22 B). Estos resultados demostraron, contra todo pronóstico, que la expresión de CnA β 1 es independiente de la unión de U1 a estas secuencias.

Pese a que la unión de U1 ha sido descrita como el mayor regulador en este tipo de procesos, algunos estudios han demostrado que la unión del exón consecutivo puede influir, en menor manera, sobre la poliadenilación alternativa de algunos transcritos (Vorlová et al, 2011). Para evaluar la influencia del exón adyacente sobre la expresión de CnA β 1 se diseñó un morpholino contra la región flanqueante del exón 13 del gen CnA β . Los resultados mostraron una bajada en la inclusión de los exones 12-13 por RT-PCR debido a la exclusión del exón 13 del transcrito final (Fig. 22 C), pero no se vio un cambio significativo en los valores de expresión de CnA β 1. Estos datos demostraron que los mecanismos reguladores de la producción de CnA β 1 son independientes del proceso de splicing de sus exones flanqueantes.

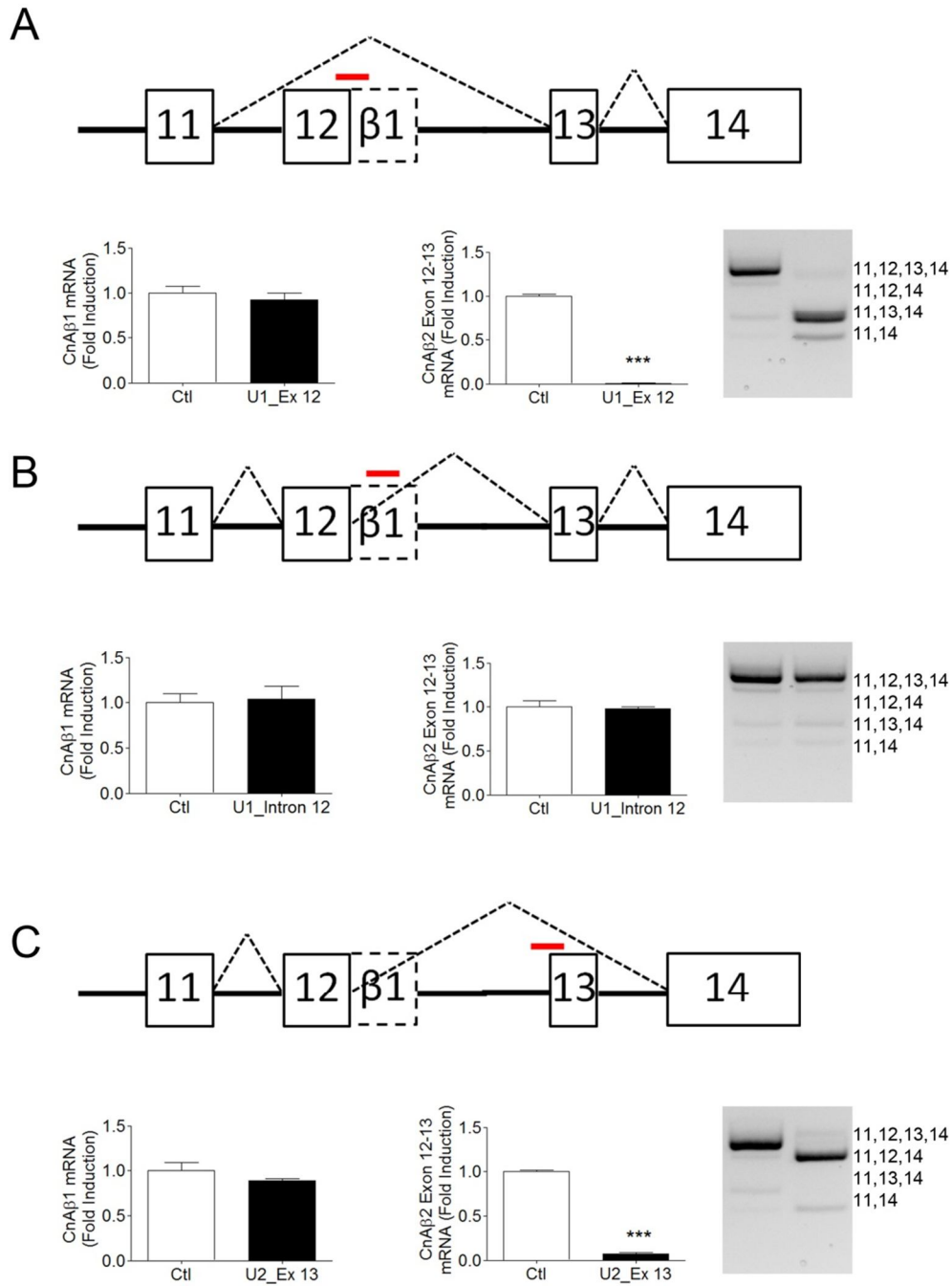


Figura 22. CnAβ1 no está regulada por la exclusión de los exones 12 o 13 de CnAβ. A-C, La expresión de CnAβ1 y la unión de los exones 12-13 se analizó por qRT-PCR y la expresión entre los exones 12-14 por RT-PCR. Se bloqueó la unión de U1 snRNP al exón 12 (A) o a un potencial sitio intrónico (B) y la unión del complejo U2 al exón 13 (C) usando distintos morpholinos (líneas rojas). Los datos están representados como la media de la inducción de la expresión génica \pm SEM. *** $p < 0.001$, T-Test ($n=3$).

La expresión de CnAβ1 está regulada por proteínas de unión al RNA

Los resultados obtenidos con los morpholinos nos sugirieron que la regulación de CnAβ1 podría estar mediada por proteínas de unión al RNA. Un artículo previo había descrito que el factor de splicing hnRNPF posee dos sitios de unión en la región 3'UTR de CnAβ1 identificados por CLIP-Seq (Huelga et al, 2012) (Fig. 23 A). Para investigar el posible papel de hnRNPF como regulador de CnAβ1, se inhibió la expresión de hnRNPF mediante un RNA horquilla-do de pequeño tamaño (short hairpin RNA – shRNA) expresado por el plásmido lentiviral PLTKO, cedido por el Dr. Gene Yeo, en células HEK-293T. Los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de CnAβ1 y una bajada en los niveles de CnAβ2 (Fig. 23 B), comparados con dos controles que contenían un shRNA contra la secuencia de la Luciferasa (Luc) o un control sin diana (non targeting control - NTC).

Dado que CnAβ1 está regulado por hnRNPF en HEK-293T, se interfirió su expresión en mESC diferenciadas a mesodermo para confirmar la regulación de CnAβ1 por esta proteína de unión a RNA en células de ratón. En este caso se usaron dos RNA de interferencia, dado que el shRNA estaba diseñado para la secuencia de CnAβ de humanos, que no es completamente homóloga a la de ratón. Curiosamente, la bajada de hnRNPF en mESC no reprodujo los resultados obtenidos en las células HEK-293T (Fig. 23 C).

Estos resultados sugerían que la regulación de CnAβ1 en mESC podía estar mediada por otras proteínas de unión a RNA. Recientemente se ha descrito que el factor de splicing Mbnl1 posee dos sitios de unión en la región C-terminal de CnAβ1 en la línea mioblástica de ratón C2C12 (Fig. 24 A) (Wang et al, 2012) , en la que la expresión de CnAβ1 está enriquecida en comparación con tejidos adultos (Fig. 24 B) (Lara-Pezzi et al, 2007; Wang et al, 2012). Así mismo, Mbnl1 y Mbnl2 han sido relacionadas con la diferenciación de mESC (Han et al, 2013), y sus sitios de unión en C2C12 están asociados con cambios de splicing en las mESC durante la diferenciación (Han et al, 2013). Como se observa en la Fig. 24 C, la inhibición de Mbnl1, pero no de Mbnl2, por RNA de interferencia produjo una disminución significativa en los niveles de transcrip-

Resultados

ción de CnA β 1 en mESC diferenciadas a mesodermo (Fig. 23 C). Estos datos demuestran que la expresión de CnA β 1 en diferentes tipos celulares depende de la unión de diferentes proteínas de unión al RNA.

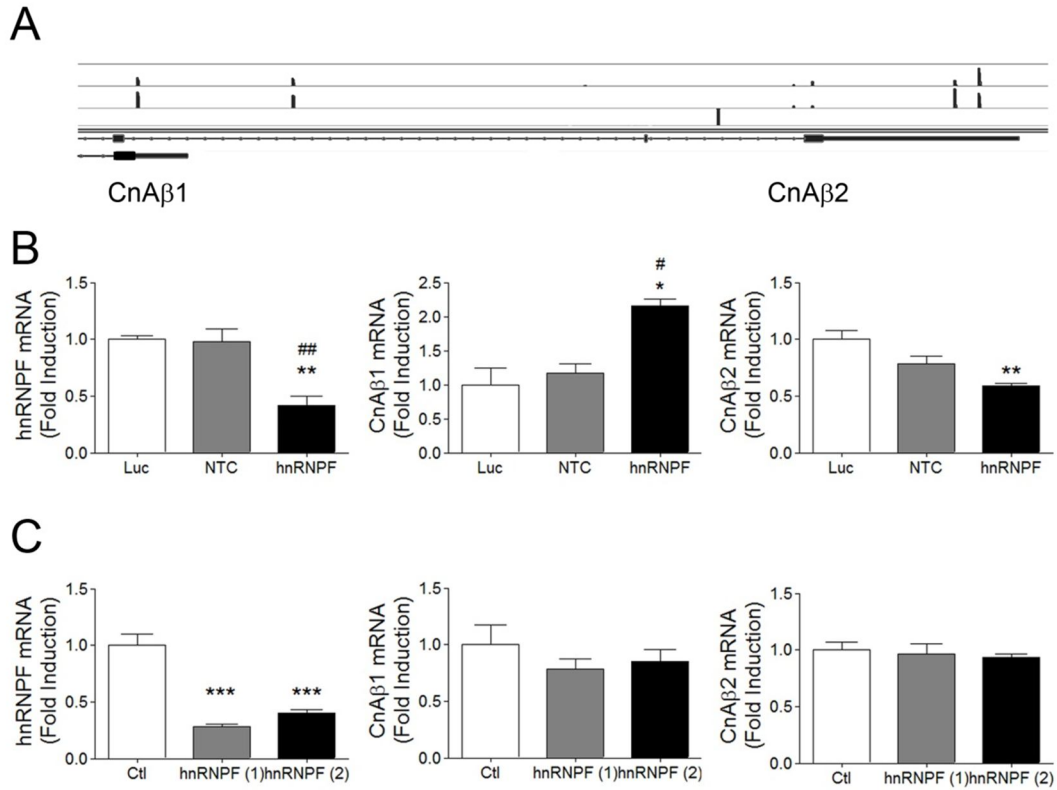


Figura 23: hnRNPF regula la expresión de CnA β 1 en células HEK 293T, pero no en células embrionarias de ratón. **A**, hnRNPF posee dos sitios de unión en CnA β descritos por CLIP-Seq en 293T (GSE34992) (Huelga et al, 2012). **B**, Análisis por qRT-PCR de hnRNPF, CnA β 1 y CnA β 2 tras la expresión de los shRNA contra Luciferasa (Luc), un transcrito no codificante (NTC) o hnRNPF en 293T usando el vector lentiviral pLTKO. **C**, Análisis por qRT-PCR de hnRNPF, CnA β 1 y CnA β 2 en células embrionarias tras la transfección de un siRNA control y dos siRNA contra hnRNPF de ratón. Los datos están representados como media de la inducción de la expresión génica \pm SEM. #p<0.05, # p<0.01 comparados con el control de Luciferasa (Luc) (B), *p<0.05, **p<0.01 comparados con el control sin diana (Non targeting control-NTC) (B), ***p<0.001 (C) ANOVA de una vía con post test de Dunnett (n=3).

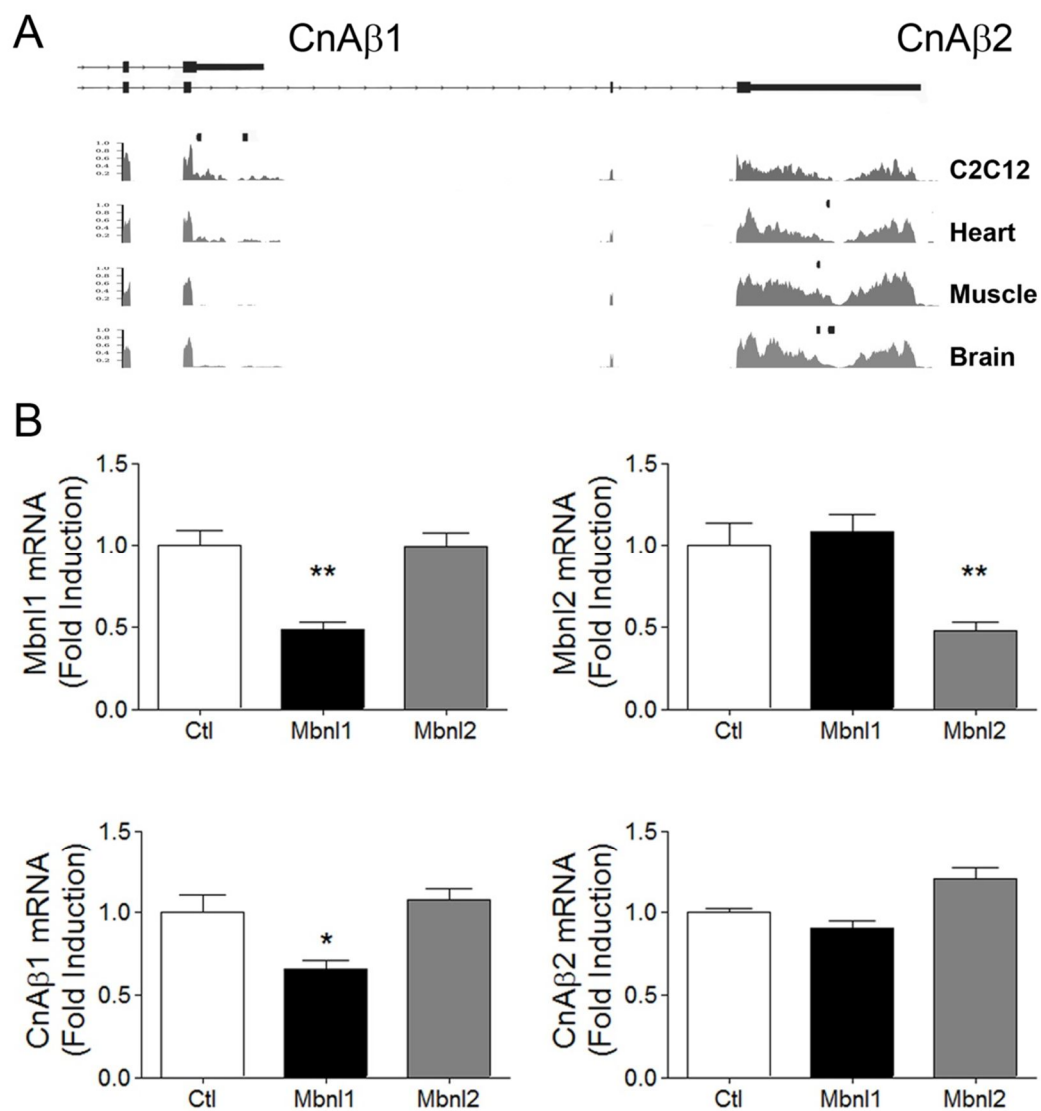


Figura 24. Mbnl1 regula los niveles de expresión CnAβ1 en células embrionarias. **A**, Datos de expresión y unión de Mbnl1 por CLIP-Seq y RNA-Seq en C2C12, corazón (heart), músculo (muscle) y cerebro (brain) de ratón en la región final del gen Ppp3cb (CnAβ) que codifica para las isoformas CnAβ1 y CnAβ2 (GSE39911); **B**, Análisis por qRT-PCR de la expresión de Mbnl1, Mbnl2, CnAβ1 y CnAβ2 tras la transfección de un conjunto de siRNA control sin diana, contra Mbnl1 o contra Mbnl2 en células embrionarias. Los datos muestran la media de la inducción de la expresión génica \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de una vía con post test de Dunnett ($n=3$).

CARACTERIZACIÓN DE UN RATÓN DEFICIENTE PARA EL INTRÓN 12-13 DE CALCINEURINA A BETA

Los ratones $\text{CnA}\beta^{\Delta i12}$ son viables

Con el fin de determinar la función *in vivo* de $\text{CnA}\beta 1$ se generó un ratón que careciese de su región C-terminal. Para ello se fusionaron los exones 12-13 eliminando la región del exón 12 extendido que codifica para el C-terminal de $\text{CnA}\beta 1$ (intron 12-13 en $\text{CnA}\beta$), de manera que sólo sería capaz de producir la isoforma $\text{CnA}\beta 2$ (Fig. 25 A). Los ratones generados se denominaron $\text{CnA}\beta^{\Delta i12}$ debido a que no solo carecían del dominio de $\text{CnA}\beta 1$, sino también del resto del intrón. Esta construcción fue introducida por recombinación homóloga en células embrionarias. Para la selección de los clones positivos se introdujo un casete de resistencia CMV-Neomicina entre dos sitios flox en el intrón 13-14 (Fig. 25 A). Para la eliminación del casete de resistencia, los ratones heterocigotos se cruzaron con un animal que sobreexpresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor Sox2. Esto logra la completa depleción del casete de resistencia en todos los tejidos adultos al ser sobreexpresado en las células embrionarias y epiblasticas del ratón.

Los ratones $\text{CnA}\beta^{\Delta i12}$ nacen siguiendo una proporción mendeliana entre cruces heterocigotos (Fig. 25 B). El análisis de embriones $\text{CnA}\beta^{\Delta i12}$ homocigotos o heterocigotos a estadio E9.5 no mostró cambios en el fenotipo comparados con los embriones control (wild type) de su misma camada (Fig. 25 C).

Al no encontrar problemas de desarrollo en los embriones, y nacer los homocigotos siguiendo las proporciones mendelianas, se procedió al análisis de los animales adultos a dos meses de edad. Los ratones $\text{CnA}\beta^{\Delta i12}$ homocigotos (en adelante ratones $\text{CnA}\beta^{\Delta i12}$) tienen un peso similar al de los animales WT y no presentan signos externos diferenciales. El análisis histológico por tinción con hematoxilina y eosina de corazón, hígado, páncreas, bazo, músculo, y

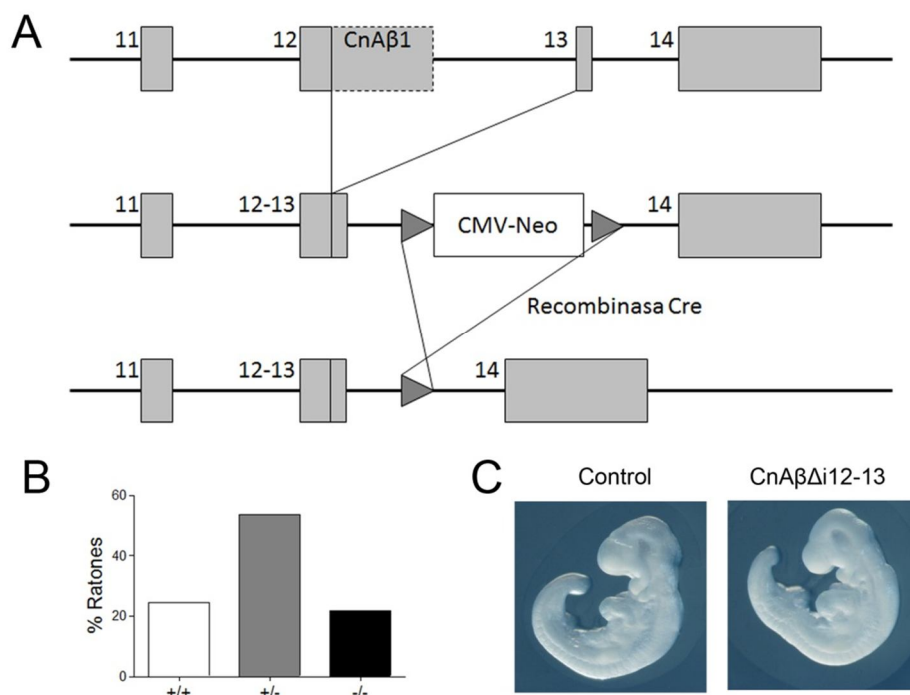


Figura 25. Los ratones $CnA\beta^{\Delta i12}$ no presentan defectos embrionarios y nacen en una proporción mendeliana. **A**, Estrategia usada para la eliminación de la región específica que codifica para el dominio C-terminal de CnAβ1. **B**, Porcentaje de ratones nacidos de cruces heterocigotos (n=69). **C**, Embriones control y $CnA\beta^{\Delta i12}$ a estadio E9.5.

pulmón no mostró signos claros de ninguna alteración patológica en estos animales (Fig. 26 A-H). Para comprobar si los animales $CnA\beta^{\Delta i12}$ eran fértiles, se cruzaron entre ellos y se obtuvieron varias camadas con una proporción de entre 7 a 10 crías por cruce. Todos estos datos confirmaron que los animales $CnA\beta^{\Delta i12}$ son viables, fértiles y en apariencia normales.

Los ratones $CnA\beta^{\Delta i12}$ no presentan alteraciones hematopoyéticas a dos meses de edad

Basándonos en los datos previos que mostraban un enriquecimiento de CnAβ1 en células embrionarias y células troncales de músculo, decidimos analizar los niveles de expresión de las isoformas de CnAβ en otros linajes de células troncales, como las de la médula ósea (Hematopoietic Stem Cells – HSC). Para determinar los niveles de expresión de CnAβ1 y CnAβ2 decidimos

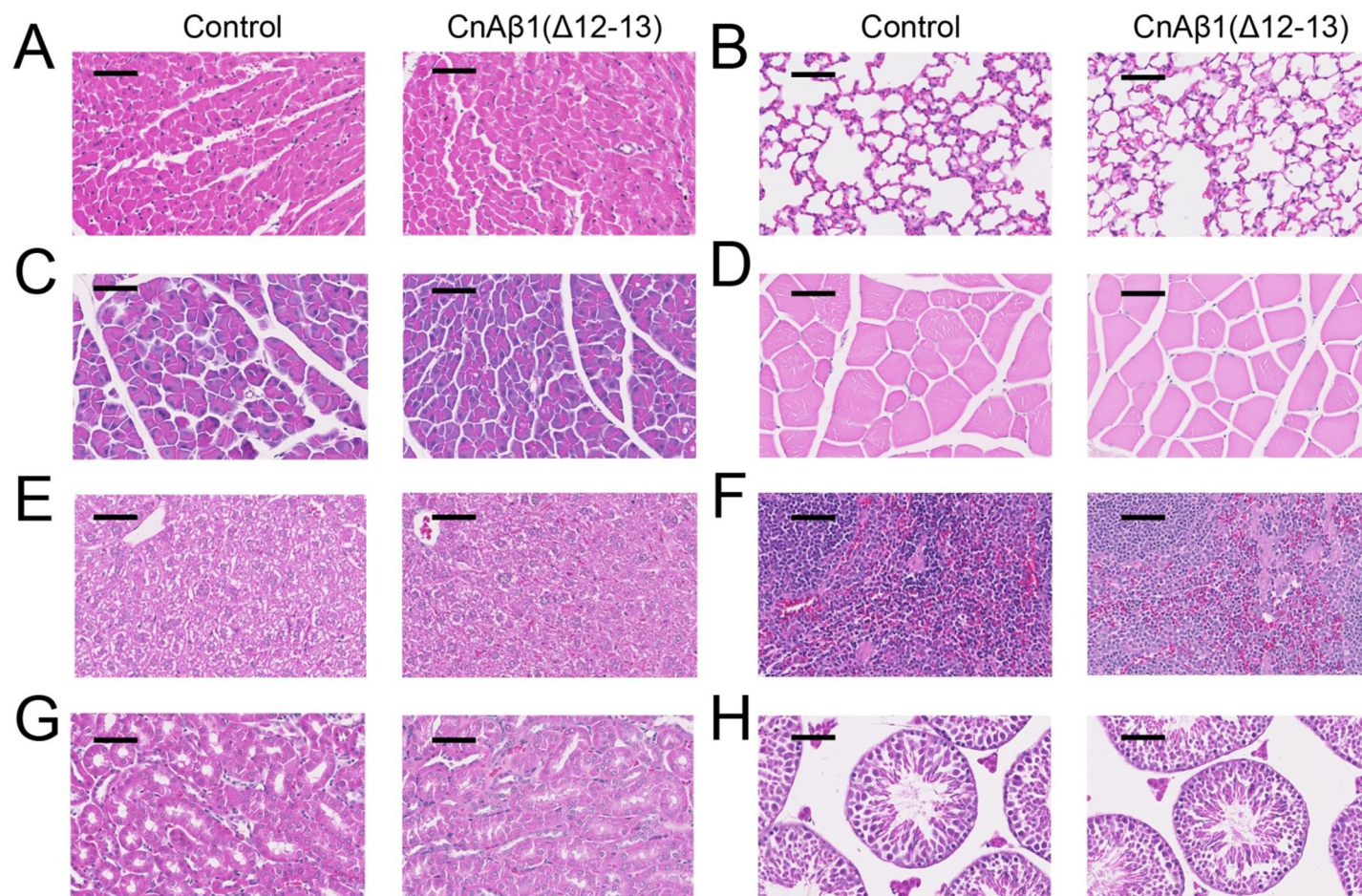


Figura 26. Los ratones $CnA\beta^{\Delta 12}$ no presentan cambios histológicos significativos. A-H, Tinción por Hematoxilina y Eosina en ratones adultos (2 meses) de corazón (A), pulmón (B), páncreas (C), músculo (D), hígado (E), bazo (F), riñón (G) y testículo (H). Barra, 50μm.

usar unos datos de expresión por microarray publicados (Galan-Caridad et al, 2007; Sung et al, 2006), donde se comparan ESC con HSC y la expresión en diferentes subpoblaciones de HSC, y cuyos resultados se encuentran accesibles en la base de datos del Gene Expression Omnibus (GEO). El análisis de sus datos de GEO (GDS2398 y GDS2718), mostró un incremento en la expresión de CnA β 1 en HSC respecto a mESC (Fig. 27 A, B), estando más enriquecida en las células troncales de tiempo corto (short term Hematopoietic Stem Cells – ST HSC). Por otro lado, los valores de expresión de CnA β 2 mostraron un patrón similar entre mESC y HSC, pero no en las ST HSC (Fig. 27 C, D). Para determinar la influencia de CnA β 1 en la producción de sangre se realizó un análisis hematológico (Tabla 10), en la que los datos analizados no mostraron ninguna diferencia significativa entre ambos grupos. Pese a no observarse cambios en el análisis hematológico, existía la posibilidad de que hubiese un cambio en la homeostasis de las células troncales hematopoyéticas (HSC). Para ello se realizó un análisis por citometría de flujo en colaboración con el grupo de la Doctora Susana González (CNIC). Para ello se procedió a la extracción de las HSC del fémur y la tibia de los animales y a su posterior marcaje con anticuerpos contra distintas proteínas de membrana específicas de linaje, marcados con fluorocromos. Los resultados no mostraron una diferencia significativa entre los animales CnA $\beta^{\Delta i12}$ y los controles (Tabla 11), aunque tampoco terminaron de ser concluyentes debido a la alta variabilidad observada dentro de los grupos, y al bajo número de animales utilizado.

Los ratones CnA $\beta^{\Delta i12}$ desarrollan hipertrofia cardiaca a con la edad

La sobreexpresión de una isoforma constitutivamente activa de calcineurina A en el corazón produce hipertrofia mal adaptativa, caracterizada por un crecimiento masivo del corazón, la aparición de fibrosis intersticial y una baja capacidad de contracción (Molkentin et al, 1998). Nosotros hemos demostrado que la sobreexpresión de CnA β 1 en el corazón adulto tras el infarto de miocardio favorece la función cardiaca por la liberación de VEGF desde los cardiomiocitos favoreciendo la vascularización del área fibrótica del corazón (López-Olañeta et al, 2014). Basándonos en estos resultados decidimos caracterizar la función

Resultados

	Uds.	WT	CnA $\beta^{\Delta 112}$	p-valor
WBC	10 ³ /mm ³	10.31	7.40	0.09
RBC	10 ⁶ /mm ³	10.28	9.55	0.43
HGB	g/dL	15.63	14.83	0.56
HCT	%	50.14	46.54	0.42
MCV	μm^3	49.00	48.57	0.54
MCH	pg	15.27	15.50	0.36
MCHC	g/dL	31.26	31.83	0.09
RDW	%	9.47	9.16	0.54
PLT	10 ³ /mm ³	931.43	1031.71	0.34
MPV	μm^3	8.10	7.73	0.44
NEUT	%	22.79	17.81	0.40
LYN	%	74.30	78.99	0.42
MONO	%	1.64	1.71	0.83
EOS	%	1.10	1.13	0.94
BASO	%	0.17	0.36	0.30
NEUT	10 ³ /mm ³	2.17	1.49	0.31
LYM	10 ³ /mm ³	7.83	5.71	0.15
MONO	10 ³ /mm ³	0.18	0.12	0.15
EOS	10 ³ /mm ³	0.11	0.08	0.34
BASO	10 ³ /mm ³	0.02	0.02	1.00

Tabla 10: Análisis hematológico de los animales control y CnA $\beta^{\Delta 112}$. La presencia de las siguientes poblaciones celulares se analizó en la sangre de los animales utilizando un citómetro Pentra 80: leucocitos (WBC), glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), ancho de distribución eritrocitario (RDW), plaquetas (PLT), volumen piastrínico medio (MPV), neutrófilos (NEUT), linfocitos (LYN), monocitos (MONO), eosinófilos (EOS), basófilos (BASO), neutrófilos (n=7).

	WT	WT	CnA $\beta^{\Delta 112}$	CnA $\beta^{\Delta 112}$
Células troncales Multipotentes	53.2	44.03	45.5	46.3
Células troncales de tiempo corto	36.8	48.2	45.4	43
Células troncales de tiempo largo	4.4	7.6	2.6	6.1
Células troncales linfoides	25.2	25.5	32.6	23.5
Células troncales mieloides	3.2	3.2	3.6	2.8

Tabla 11: Análisis de las poblaciones de células troncales hematopoyéticas (HSC). Las diferentes poblaciones de células troncales se analizaron usando los siguientes marcadores: células troncales multipotentes (Lin⁻cKIT⁺Sca1⁺CD135⁻CD34⁺), células troncales de tiempo corto (Lin⁻cKIT⁺Sca1⁺CD135⁻CD34^{bajo}), células troncales de tiempo largo (Lin⁻cKIT⁺Sca1⁺CD135⁺CD34^{bajo}), células troncales linfoides (Lin⁻cKIT^{bajo}, Sca1^{bajo}, CD127⁺), células troncales mieloides (Lin⁻cKIT⁺Sca1⁺).

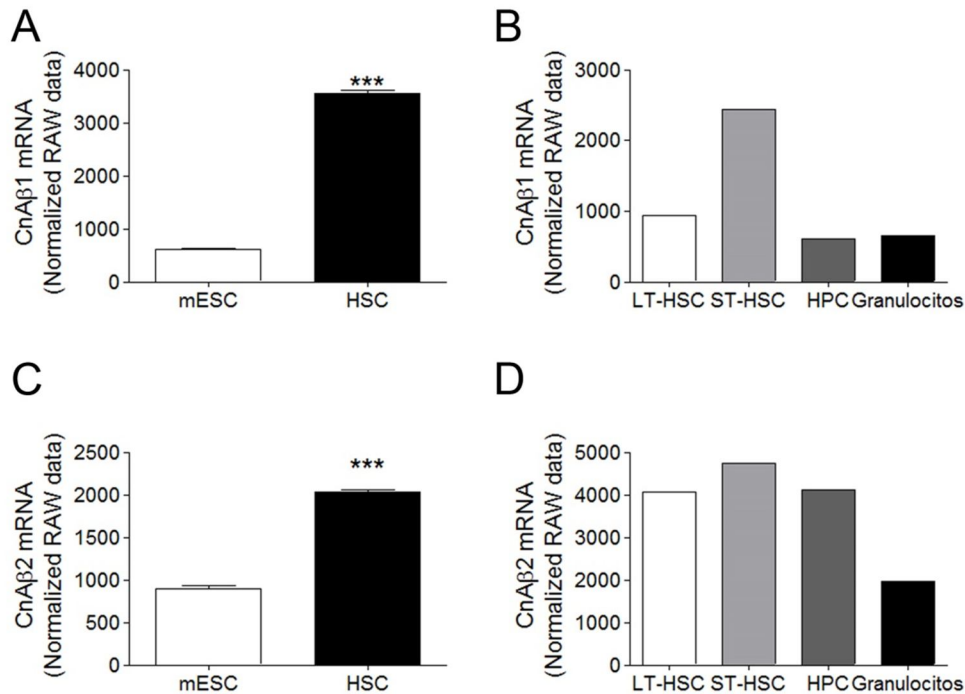


Figura 27. La expresión de CnAβ1 es más alta en células troncales hematopoyéticas. A-D, Valores normalizados para la sonda específica de CnAβ1 1433835_at o CnAβ2 148473_at de los microarrays de Affimetrix. La comparación entre mESC y HSC pertenece al experimento GDS2398 (n=2), y la comparación de la expresión a diferentes estadios al experimento GDS2718 (n=1). Los datos se han expresado como media de la señal en el microarray para cada sonda \pm SEM. ***p<0.001 T-Test (GDS2398).

de CnA β 1 en el corazón por una parte en ratones a distintas edades y por otra en un modelo de sobrecarga de presión, que induce una hipertrofia ventricular maladaptativa similar a la que se desarrolla en humanos en respuesta a estenosis aórtica.

El análisis ecocardiográfico de la función y la estructura cardíaca no mostró diferencias entre los ratones wild type y los CnA $\beta^{\Delta i12}$ a dos y ocho meses de edad. Sin embargo los ratones CnA $\beta^{\Delta i12}$ desarrollaron una hipertrofia cardíaca que se manifestó a partir de los 15 meses de edad, junto a una dilatación del ventrículo izquierdo (Tabla Suplementaria 5). Los resultados ecocardiográficos muestran un incremento significativo en la masa del corazón a 15 meses de edad (Fig. 28 A), asociada a un incremento en la masa de la pared posterior (Fig. 28 B) y la pared anterior (Fig. 28 C). Así mismo se observó una dilatación del ventrículo izquierdo medida por el volumen en diástole (Fig. 28 D), y una menor capacidad de contracción medida por el volumen en sístole (Fig. 28 E), que produce la disminución en la fracción de eyección (Fig. 28 F). Curiosamente, el análisis por QRT-PCR de la expresión de CnA β 1 y CnA β 2 mostró un incremento significativo en los niveles de expresión de ambas isoformas a 15 meses de edad (Fig. 29 A, B), que fue más pronunciado en el caso de CnA β 1 (Fig. 29 A).

Para intentar identificar si el fenotipo observado se debe a un problema cardíaco o está asociado a otros factores externos se midió la presión arterial a 2 y 15 meses (Fig. 30 A, B). Los resultados no mostraron ningún cambio significativo entre los grupos, sugiriendo que el problema podía estar asociado a algún problema en el corazón, aunque no podemos descartar otras posibilidades como la estenosis aórtica.

La actividad de calcineurina/NFAT se ha descrito como uno de los principales mediadores de la respuesta hipertrófica en el corazón. Uno de los principales genes activados por NFAT es la isoforma de Rcan1 Rcan1.4, cuya expresión está controlada por un multímero de sitios de unión a NFAT, mientras que la isoforma Rcan1.1 no depende de la activación de este factor de transcripción (Fig. 31 A) (Canellada et al, 2008; Esteban et al, 2011). A los 2 meses

de edad no se observaron diferencias en la expresión de ninguna de las isoformas de Rcan1 (Fig. 31 B, C)). A los 15 meses se observó una inducción significativa en Rcan1.1 con respecto a 2 meses, aunque no se encontraron diferencias entre los dos grupos de ratones (Fig. 31 B). Por el contrario, la isoforma Rcan1.4 sufrió un aumento significativo en los ratones $\text{CnA}\beta 1^{\Delta i12}$

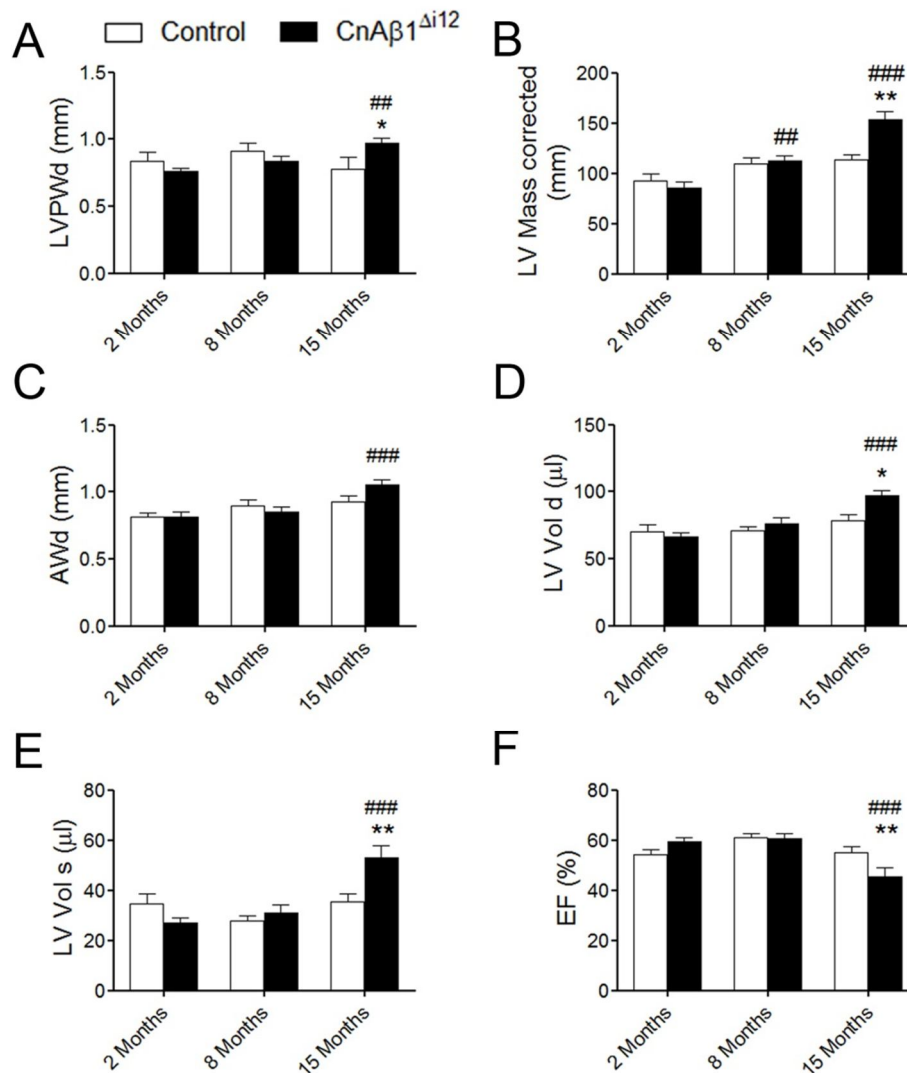


Figura 28. Los ratones $\text{CnA}\beta 1^{\Delta i12}$ desarrollan hipertrofia y dilatación ventricular a los 15 meses. A-F Medidas ecográficas de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (LVPWd), la masa ventricular corregida del ventrículo izquierdo (LV Mass corrected), la pared anterior del ventrículo izquierdo en diástole (AWd), volumen del ventrículo izquierdo en diástole (LV Vol d), volumen del ventrículo izquierdo en sístole (LV Vol s), y la fracción de eyección (EF). Los datos se han expresado como media de los valores \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto del grupo control a cada tiempo analizado. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ respecto de los animales de ese grupo a dos meses, ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni ($n \geq 7$).

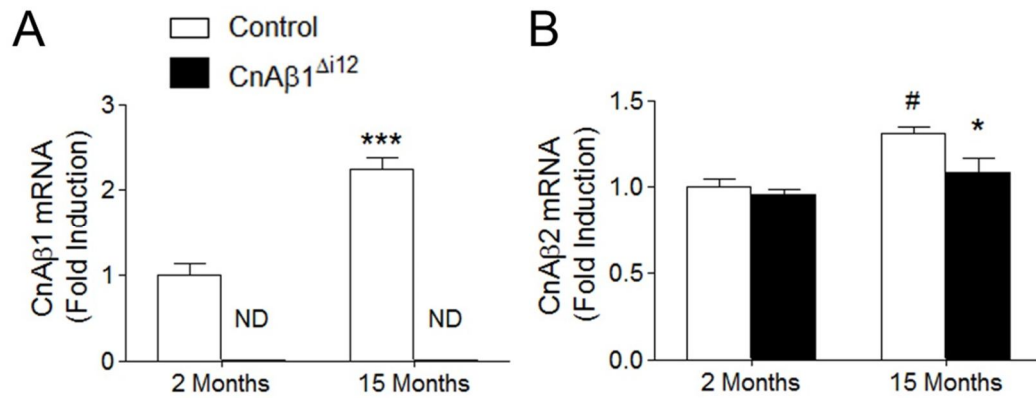


Figura 29. La expresión de las isoformas CnAβ1 y CnAβ2 se incrementa con la edad. A, B, Análisis cuantitativo de la expresión de CnAβ1 y CnAβ2 en los ratones a 2 y 15 meses de edad en ratones control y CnAβ^{Δi12}. Los datos están expresados como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ respecto del grupo control al tiempo analizado, # $p < 0.05$ respecto del mismo grupo a 2 meses. ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni.

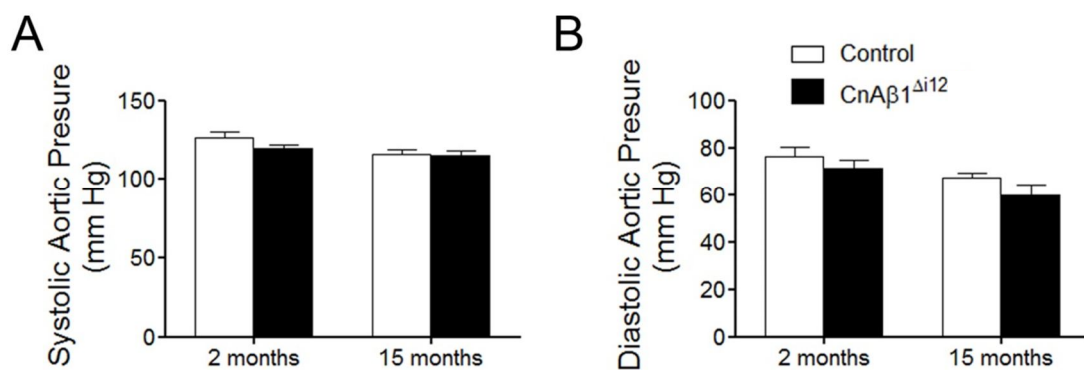


Figura 30: La presión arterial no está alterada en los animales CnAβ^{Δi12}. A,B, Presión arterial medida en la cola de los animales en un equipo BP2000 (Visitech Systems) a 2 y 15 meses de edad en ratones despiertos. Los datos se han expresado como media \pm SEM, $p > 0.05$, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en un ANOVA de dos vías ($n \geq 7$).

comparados con los controles, en los que se indujo de una forma más moderada (Fig. 31 C), sugiriendo que el aumento observado en los animales CnAβ^{Δi12} es consecuencia y no causa de la hipertrofia, dado que a dos meses no se observó una inducción.

El análisis de la expresión de marcadores de insuficiencia e hipertrofia cardíaca a 15 meses mostró un ligero incremento significativo en la expresión de BNP, pero no de ANF (Fig. 32 A, B). Así mismo, no se observaron cambios significativos en la expresión de los marcadores de fibrosis colágeno I $\alpha 1$

(Col1a1) o lisil oxidasa (Lox), encargada de la maduración de las fibras de colágeno (Fig. 32 C, D). Esto podría ser debido a que el desarrollo de la enfermedad se encontraba en una fase inicial, y que aun necesitaba más tiempo para activar diferentes vías implicadas en el remodelado cardiaco.

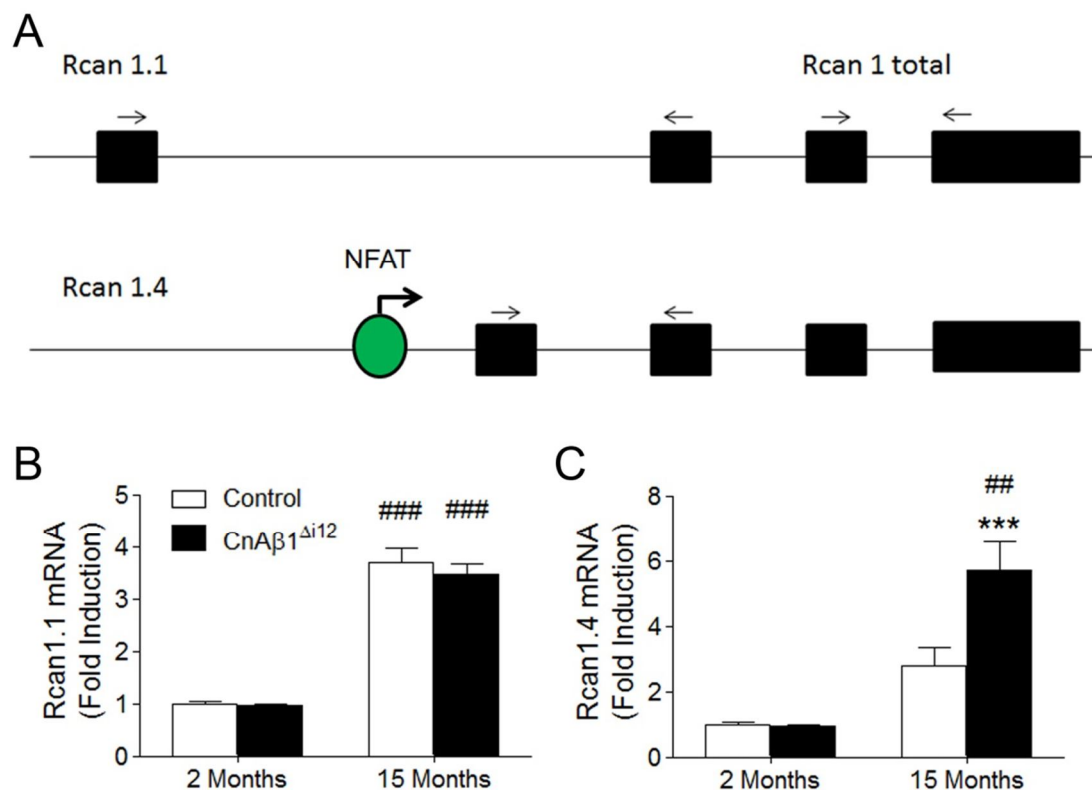


Figura 31. La expresión de Rcan1.4 a 15 meses de edad está elevada en los ratones CnAβ1^{Δ12}. A, El gen Rcan produce al menos dos isoformas controladas por dos promotores independientes, Rcan 1.1 y Rcan 1.4, de las que sólo Rcan1.4 es inducida por NFAT. Las flechas indican la posición de los cebadores usados para la amplificación por QRT-PCR. B,C Inducción de la expresión de las isoformas de Rcan1: Rcan1.1 y Rcan1.4 a 2 y 15 meses. Los datos están representados como media de la inducción de la expresión génica \pm SEM. ***p<0.001 respecto del grupo control al tiempo analizado; ##p<0.01, ###p<0.001 respecto de los animales de ese grupo a dos meses, ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni (n≥7).

La sobreexpresión de CnAβ1 en el corazón disminuye el remodelado tras la constricción aórtica

Nuestros resultados previos han demostrado el beneficio de la sobreexpresión de CnAβ1 en el corazón tras el infarto de miocardio (Felkin et al, 2011; López-Olañeta et al, 2014). Así mismo no hemos observado un desarrollo de

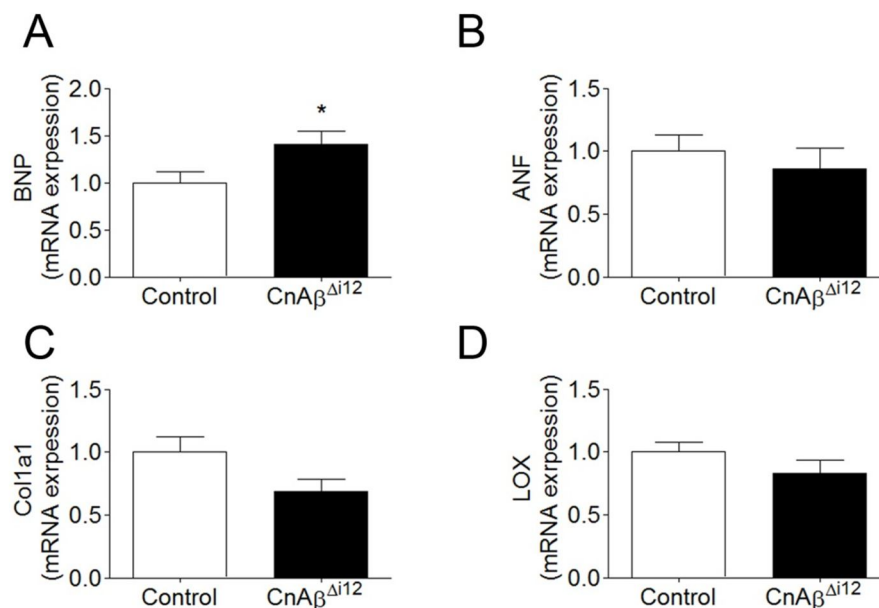


Figura 32. Los ratones CnAβ1^{Δ12} presentan un incremento significativo de BNP a 15 meses de edad. A-D, Expresión de los marcadores de insuficiencia e hipertrofia cardiaca BNP, ANF y los marcadores de fibrosis Col1a1 y LOX en ratones control y CnAβ1^{Δ12} a 15 meses de edad. Los datos están representados como media de la inducción de la expresión génica \pm SEM. * $p < 0.05$ T-Test ($n = 19$).

problemas cardiacos con el tiempo en estos ratones (Felkin et al, 2011), demostrando que a diferencia de otras calcineurinas (Molkentin et al, 1998), la sobreexpresión de CnAβ1 no es perjudicial para el corazón.

Para determinar si la sobreexpresión de CnAβ1 es beneficiosa en el contexto de sobrecarga por presión, decidimos usar un modelo de hipertrofia cardiaca maladaptativa inducida por la oclusión parcial del callado aórtico mediante su ligadura parcial (Trans Aortic Constriction - TAC). Esto genera un incremento significativo en la presión intracardiaca en el ventrículo izquierdo que tiene que ser compensada por una hipertrofia del mismo. Como control se usaron ratones operados a los que se había abierto el pecho de forma similar, pero a los que no se realizó la constricción aórtica (Sham). Para estudiar la función de CnAβ1 específicamente en los cardiomiocitos se usó una línea de ratón transgénico que contenía la construcción α MHC-CnAβ1, que expresa la isoforma CnAβ1 bajo el control del promotor cardio-específico α MHC de cardiomiocitos. Estos experimentos fueron llevados a cabo por la técnico de laboratorio Marina Mercedes López Olañeta y por la Dra. María Villalba en el grupo.

Los resultados mostraron una reducción significativa de la masa ventricular en relación al peso del ratón (Fig. 33 A) y en su medida ecográfica (Fig. 33 B), así como del grosor de la pared posterior y el septo interventricular (Fig. 33 C, D) en los ratones que sobreexpresan CnA β 1 comparados con los ratones control 21 días tras el TAC (Tabla Suplementaria 6). La cuantificación del área de los cardiomiocitos en secciones mediante técnicas de histología mostró una reducción significativa del tamaño de éstos en los ratones que sobreexpresaban CnA β 1 (Fig. 33 E). Así mismo, los ratones α MHC-CnA β 1 mostraron una

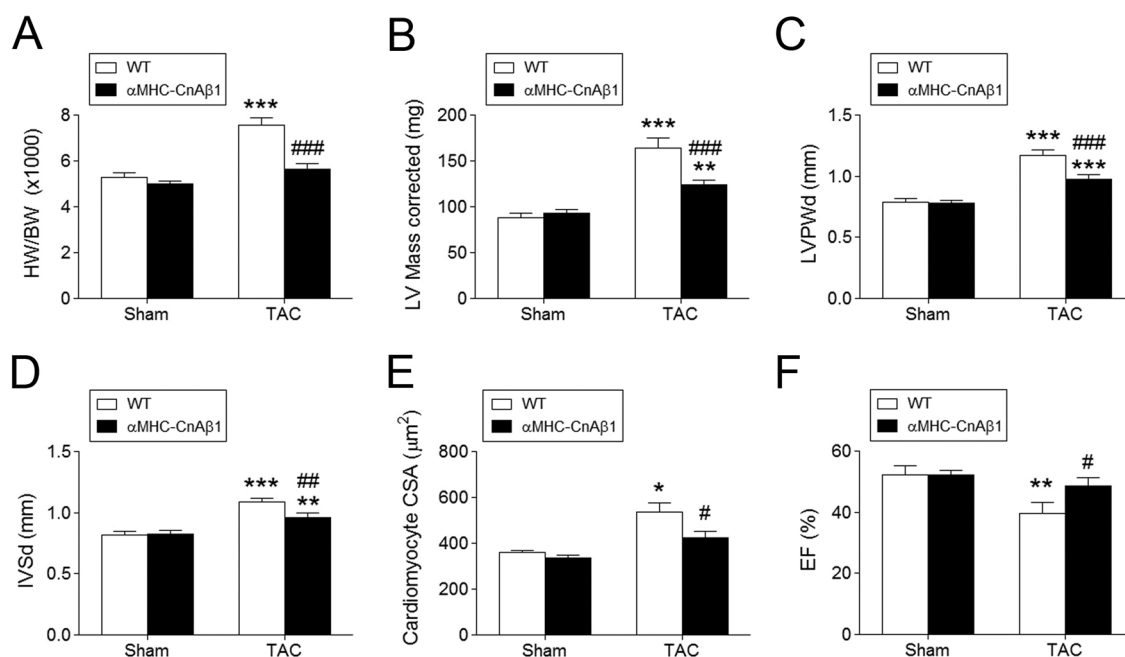


Figura 33. La sobreexpresión de CnA β 1 reduce la hipertrofia cardiaca. **A**, Se indujo una hipertrofia cardiaca por el aumento de presión en el ventrículo izquierdo en ratones control (WT) y sobreexpresantes de CnA β 1 (α MHC-CnA β 1) por la constricción de la aorta y se determinó el peso del corazón dividido entre el peso del ratón (HW/BW) 21 días después de la cirugía. Como control se utilizó una cirugía en la que se abre el pecho pero no se realiza la constricción de la aorta (Sham). **B-D**, La masa del ventrículo izquierdo (**B**) y, el grosor de la pared posterior (LVPW) y el septo interventricular (IVS) (**C,D**), se analizaron por ecografía 21 días después de la ligadura. **E**, Análisis del tamaño de los cardiomiocitos en cortes analizados por inmunohistoquímica. **F**, La fracción de eyección se determinó en los ratones 21 días después de la ligadura. Los datos están representados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ TAC vs Sham para cada línea de ratón; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$ WT vs transgénico; ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni ($n \geq 13$).

Resultados

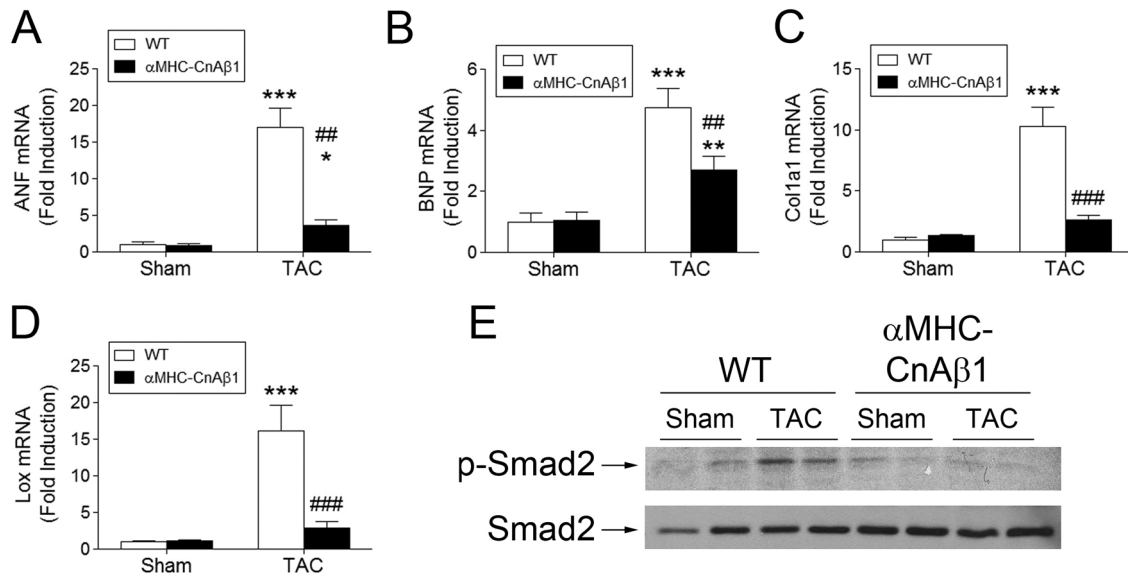


Figura 34. La sobreexpresión de CnAβ1 disminuye la inducción de los marcadores de insuficiencia cardíaca y fibrosis. A-D, Se indujo una hipertrofia cardíaca por el aumento de presión en el ventrículo izquierdo en ratones control (WT) y sobreexpresantes (αMHC-CnAβ1) por la constricción de la aorta y se analizó la inducción de la expresión de los marcadores de insuficiencia cardíaca ANF y BNP (A,B) o de fibrosis Col1a1 y Lox (C,D) 21 días después de la ligadura. **E,** Análisis de la fosforilación de Smad2 en el corazón 21 días después de la inducción de una hipertrofia cardíaca. Los ratones Sham fueron operados, pero no se les indujo la hipertrofia cardíaca, mientras que sí se hizo con los TAC. Los datos están representados como \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ TAC vs Sham para cada línea de ratón; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$ WT vs transgénico; ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni ($n \geq 13$).

mayor capacidad de contracción tras el TAC que los ratones wild type (Fig. 33 F), así como una menor expresión de los marcadores de daño cardíaco ANF y Acta1 (Fig. 34 A, B), que se encontraban muy inducidos en los ratones control.

La inducción de hipertrofia por el incremento de presión intraventricular se caracteriza por la aparición de fibrosis intersticial y perivascular. Los resultados mostraron una reducción en los niveles de expresión de colágeno (Col1a1) y de la lisil oxidasa (Lox) (Fig. 34 C, D). Por otro lado, también se observó una reducción en los niveles de fosfo-SMAD2 en los ratones sobreexpresantes (Fig. 34 E), que sugería una inhibición parcial de la vía de señalización de TGF-β, que promueve la fibrosis. Estos datos fueron validados histológicamente en los ratones αMHC-CnAβ1. Al analizar los niveles de fibrosis en una tinción de tri-crómico de Masson 21 días tras la TAC (Fig. 35 A-D), se observaron en los ratones que sobreexpresaban CnAβ1 unos valores cercanos a los de los ratones

sin sobrecarga de presión, significativamente menores que los de los ratones wild type tras la TAC.

Como se ha mencionado anteriormente, la ruta de señalización de calcineurina/NFAT es uno de los principales mediadores en la hipertrofia cardíaca. Se decidió analizar la actividad de NFAT con el fin de determinar si la sobreexpresión de CnA β 1 pudiese actuar como un inhibidor natural al secuestrar todas

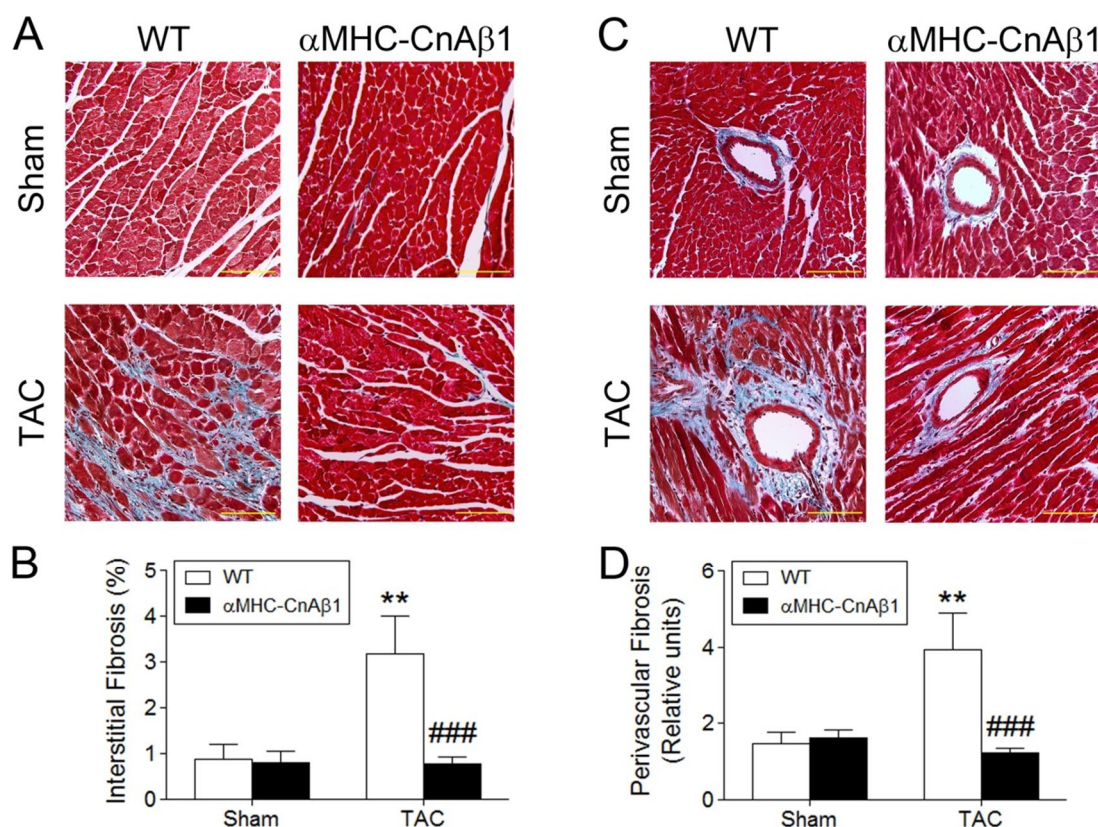


Figura 35. La sobreexpresión de CnA β 1 reduce la fibrosis cardíaca. **A**, Se indujo hipertrofia cardíaca por el aumento de presión en el ventrículo izquierdo en ratones control (WT) y sobreexpresantes (α MHC-CnA β 1) por la constricción de la aorta (TAC) o se llevó a cabo una cirugía control (Sham) y se analizó la fibrosis por histología 21 días después de la TAC mediante una tinción de tricrómico de Masson. Barra, 100 μ m. **B**, Cuantificación de la fibrosis intersticial como el porcentaje de área en cada imagen que estaba teñida con colágeno, respecto al tejido total en la imagen. **C**, La inducción de hipertrofia cardíaca se realizó como en (**A**) y se analizó la fibrosis por histología con una tinción de tricrómico de Masson. **D**, Cuantificación de la fibrosis perivascular relativa al grosor del área del vaso. Los valores están expresados como media \pm SEM. * p <0.05 TAC vs Sham para cada línea de ratón; # p <0.05 WT vs transgénico; ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. $n \geq 13$, se analizaron al menos 2 imágenes por animal.

Resultados

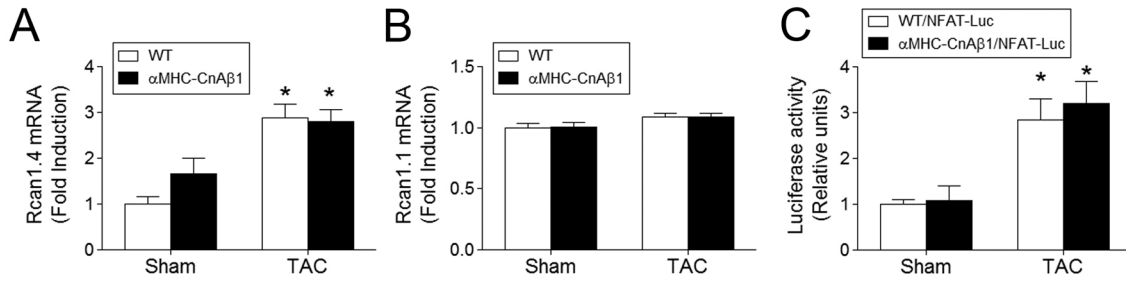


Figura 36. La sobreexpresión de CnA β 1 no inhibe la activación de NFAT. **A,B**, Inducción de la expresión de Rcan1.1 y Rcan1.4 en ratones control (WT) y ratones con una inducción constitutiva de CnA β 1 en cardiomiocitos (α MHC-CnA β 1) en condiciones sin la inducción de hipertrofia (Sham) y tras la inducción de una hipertrofia aguda por la ligadura de la aorta (TAC). **C**, Análisis de la actividad de Luciferasa en ratones control (WT/NFAT-Luc) y sobreexpresantes de CnA β 1 (α MHC-CnA β 1/NFAT-Luc), en los que la expresión de luciferasa está controlada por un multímero de sitios de unión de NFAT, en condiciones similares a las de **A** y **B**. * $p < 0.05$ respecto de la condición Sham en cada grupo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las condiciones Sham o TAC ($p > 0.05$), ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. $n \geq 7$ (A,B), $n \geq 5$ (C)

las moléculas de la subunidad reguladora de calcineurina CnB u otras proteínas que se unen a CnA, y competir así con la calcineurina endógena de tal manera que la sobreexpresión de CnA β 1 se convirtiera en un inhibidor indirecto de su actividad. Para ello se analizó la expresión de las diferentes isoformas del gen Rcan1. Nuestros resultados mostraron una fuerte inducción de la expresión de Rcan1.4 (Fig. 36 A), que se encuentra fuertemente regulada por NFAT, pero no en Rcan1.1 (Fig. 36 B) en los modelos de hipertrofia. No se observaron diferencias entre los ratones control y los ratones sobreexpresantes (Fig. 36 A), sugiriendo que la actividad de NFAT no se encontraba alterada por la inducción de CnA β 1. Para confirmar estos resultados, se cruzaron los ratones α MHC-CnA β 1 con unos ratones que expresan el gen reportero Luciferasa bajo el control de un promotor con 9 sitios de unión para NFAT junto a un promotor mínimo de CMV. Los resultados mostraron una fuerte inducción de Luciferasa tras la hipertrofia cardíaca, coincidiendo con la inducción de Rcan1.4 (Fig. 36 C), sin encontrarse diferencias significativas entre los dos grupos. Todos estos resultados demuestran que CnA β 1, a diferencia de otras calcineurinas, reduce el remodelado cardíaco tras el incremento de presión intracardíaca, sin alterar la señalización de NFAT.

5

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

CnAβ1 regula la diferenciación a mesodermo controlando la señalización de Akt desde el Golgi

Las diferencias en la expresión de CnAβ1 entre células embrionarias y tejidos de ratones a diferentes estadios post-parto sugirieron una función de CnAβ1 en células embrionarias. Resultó interesante observar que los niveles de CnAβ1 se inducían durante la diferenciación hacia mesodermo temprano, pero no ectodermo, que sus niveles se encontraban también más elevados a tiempo P1 en algunos órganos derivados de éste linaje (corazón y riñón) y que su expresión decaía con el tiempo, sugiriendo también un papel en el proceso de diferenciación.

Nuestros datos demuestran esta hipótesis inicial al mostrar una pérdida en la capacidad de diferenciación de las células embrionarias hacia mesodermo tras la inhibición de la expresión de CnAβ1. Así mismo, hemos demostrado que el mecanismo molecular mediante el cual favorece la diferenciación hacia linaje mesodérmico es mediante el control de la activación de Akt y la posterior regulación de la vía de señalización de GSK3β y β-catenina.

Pese a la importancia que el AS tiene en la diversidad proteica, son pocos los estudios que han tratado de identificar las propiedades alternativas que los exones alternativos pueden ejercer sobre la estructura (Rodriguez et al, 2013; Tress et al, 2007). Pese a las conclusiones extraídas de estudios globales (Djebali et al, 2012; Tress et al, 2007), el estudio de la generación de nuevas proteínas por AS ha sido mejor caracterizada por algunos estudios individuales (Gabut et al, 2011; Lu et al, 2014), mostrando las implicaciones reales que el AS puede tener sobre las proteínas a nivel funcional. La caracterización estructural de CnAβ1, mediante la generación de un modelo estructural usando el software Itaser, nos indicó la existencia de dos α-hélices en la región C-terminal. La alta conservación evolutiva de CnAβ1 nos permitió compararla con

la de otras especies y ver que ambas hélices se encuentra evolutivamente conservadas y parecen tener funciones diferentes sobre la función de CnA β 1.

A lo largo del texto hemos demostrado como la segunda α -hélice posee la información suficiente y necesaria para dirigir la localización de CnA β 1 al aparato de Golgi, y que ésta es requerida para la activación de la ruta de señalización de Akt por CnA β 1. Curiosamente, la vía de señalización de Akt/mTOR ha sido previamente asociada a éste orgánulo (Schenck et al, 2008; Schroder et al, 2007; Thomas et al, 2014; Xiangyu & X F Steven, 2007; Yuan et al, 2015), y algunas proteínas del Golgi como Golph3 han sido directamente relacionadas con la fosforilación de la S473 que realiza mTORC2 (Scott et al, 2009). La región responsable de la localización en el Golgi de CnA β 1 es similar a la región de mTOR que lo localiza en este mismo orgánulo (Xiangyu & X F Steven, 2007), lo que contribuiría a explicar la capacidad de CnA β 1 para activar la ruta de señalización Akt mediante su localización en el aparato de Golgi mediada por Cog8.

Los estudios previos relacionados con la función de Cog8 la han descrito como una proteína de membrana que interacciona con los complejos Cog y SNARE requeridos para el anclaje y transporte de vesículas al Golgi (Willett et al, 2013). No obstante, y al igual que ha sido descrito para otras proteínas del aparato de Golgi como Golph3 o GM130 (Dippold et al, 2009; JH et al, 2015), es posible que las interacciones de Cog8 descritas hasta la fecha no sean las únicas, como nosotros hemos observado en el caso de CnA β 1. La localización en el Golgi de los complejos mTORC1 y mTORC2 tiene además un sentido funcional, dado que ambos juegan un papel en la regulación del movimiento celular (Liu et al, 2010; Sarbassov et al, 2004), y el aparato de Golgi juega un papel muy importante en la organización de los microtúbulos (Millarte & Farhan, 2012; Miller et al, 2009; Rivero et al, 2009; Sütterlin & Colanzi, 2010). Nuestros datos sugieren que, la regulación funcional de Akt en el aparato de Golgi es necesaria para el proceso de diferenciación, y está de acuerdo con la literatura anterior donde se describe que la regulación de Akt en diferentes dominios subcelulares puede determinar la especificidad funcional de esta ruta de señalización (Betz & Hall, 2013; Thomas et al, 2014). En línea con estos resultados

existen varias isoformas de mSin1, que forman parte del complejo mTORC2 (Schroder et al, 2004; Yuan et al, 2015), de las cuales tan solo 1 se localiza en el Golgi (Yuan et al, 2015). Esta isoforma es capaz de regular la fosforilación de Akt en la S473 (Frias et al, 2006; Yuan et al, 2015). Así mismo se han descrito varias isoformas del gen Protor1, del complejo mTORC2, de las cuales tan solo 2 interaccionan con Rictor (Pearce et al, 2007). Aunque no se han publicado la existencia de diferentes isoformas para Rictor, una búsqueda en Ensembl muestra la existencia de múltiples isoformas para este gen, muchas de ellas eliminando la región terminal de la proteína, lo que sugiere que hay diversas isoformas con distintas funciones. Por otra parte, la localización de diferentes proteínas específicas del complejo mTORC2, Rictor y mSin1, ha sido relacionada con el Retículo Endoplásmático (ER) o el aparato de Golgi respectivamente (Betz et al, 2013; Boulbés et al, 2011; Schroder et al, 2007; Yuan et al, 2015). Debido a que la fosforilación de Akt en la S473 se produce en un dominio hidrofóbico, se sugirió durante un tiempo que ésta debía ser cotraduccional, lo cual fue demostrado hace unos años (Oh et al, 2010). Estos resultados, junto a la localización de Rictor en el ER (Betz et al, 2013; Boulbés et al, 2011) han promovido la hipótesis de que Akt es fosforilada por mTORC2 en éste orgánulo (Betz & Hall, 2013) y han dejado de lado la localización de mSIN1 en el Golgi (Schroder et al, 2007; Yuan et al, 2015). Sin embargo, un estudio reciente en el que se han identificado todas las proteínas que son producidas por los ribosomas del ER usando RNA-Seq, no ha identificado ni Akt, ni Rictor entre sus candidatos (Jan et al, 2014). Existe la posibilidad de que Rictor fosforile Akt en el ER de manera cotraduccional haciendo uso de ribosomas libres, no obstante, y a la luz de la diferente localización de las proteínas del complejo mTORC2 y de la existencia de diferentes complejos mTORC2 (Frias et al, 2006), será importante revisar los datos hasta ahora publicados. Todos estos resultados muestran la existencia no sólo de diferentes complejos mTORC2 (Frias et al, 2006), sino también de diferentes localizaciones de los mismos (Yuan et al, 2015). Así mismo, algunos de estos complejos se han relacionado con funcionalidades diferentes relacionadas con la activación de Akt en diferentes dominios celulares ante diferentes estímulos (Frias et al, 2006). En el futuro será muy interesante estudiar cómo la localización subcelular y composición de cada uno de estos complejos regulan la activación de Akt para desencadenar di-

ferentes respuestas fisiológicas y cuáles son las relaciones entre su localización y su función en cada orgánulo.

La función de Akt en mESC es controvertida, habiendo algunos artículos que la han relacionado con el mantenimiento de la pluripotencia (Niwa et al, 2009; Watanabe et al, 2006), y otros que han sugerido un papel más importante en diferenciación (Naito et al, 2005). Estos datos pueden estar asociados a la regulación de Akt por diferentes complejos. Unos resultados similares se han descrito también para la función de β -catenina en las mESC donde, dependiendo del complejo al que se une, puede tener efectos opuestos (Lindsley et al, 2006; Miyabayashi et al, 2007). En esta línea, nosotros no hemos observado ninguna contribución al mantenimiento de la pluripotencia por parte de CnA β 1, mientras que sí hemos observado una disminución en la capacidad de las mESC de diferenciarse a mesodermo cuando hemos inhibido CnA β 1, cuyo efecto estaba mediado por la vía de señalización de Akt/GSK3/ β -catenina. La necesidad de la localización específica en el aparato de Golgi por parte de CnA β 1 para activar esta vía de señalización refuerza la idea de que, la activación de Akt y sus dianas en diferentes dominios subcelulares, puede contribuir a su función en mESC tanto en pluripotencia como en diferenciación.

La función de calcineurina durante la diferenciación de las mESC también está poco clara. Algunos artículos sugieren que su subunidad reguladora, la cual se une a todas las isoformas de CnA, es necesaria para que las mESC se diferencien a todos los linajes mediante un mecanismo que requiere la activación del factor de transcripción NFAT (Li X et al, 2011). En comparación, un reciente trabajo sugiere que la actividad de CnB puede ser necesaria únicamente para la diferenciación a ectodermo, pero dispensable para la formación del mesodermo y el endodermo, mediante el control de la señalización de BMP por la interacción directa de CnA con Smad1/5 (Cho et al, 2014). Por otro lado, los animales Knockout de CnA β , generados por la eliminación del exón que codifica para el bolsillo catalítico del enzima, son viables y no parecen presentar defectos embrionarios (Bueno et al, 2002), lo que sugiere que la actividad fosfatasa del enzima no es esencial para la diferenciación de las mESC, o que

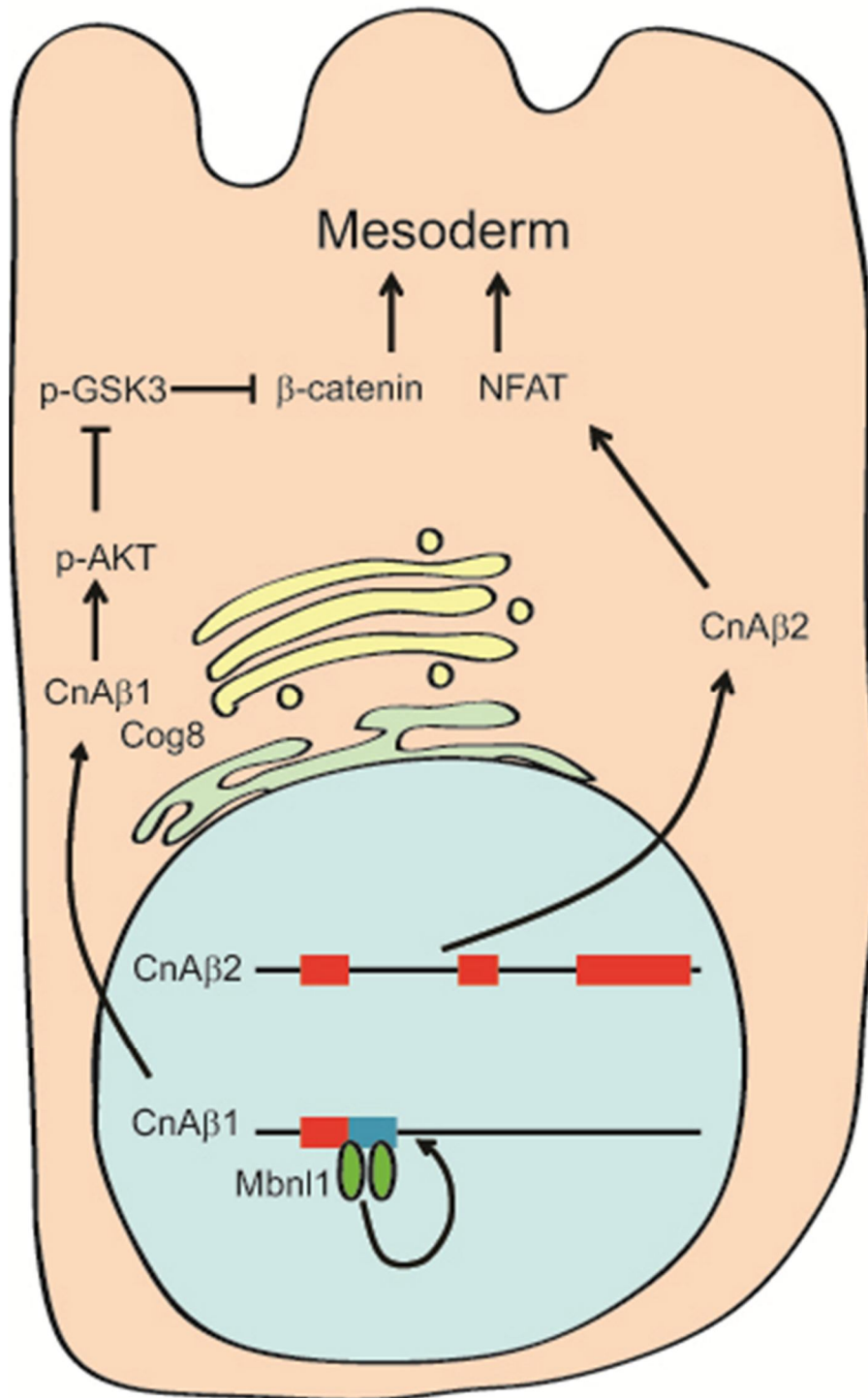


Figura 37: Las isoformas de CnAβ regulan la diferenciación a mesodermo controlando AKT o NFAT. El gen CnAβ produce dos isoformas que regulan la diferenciación a mesodermo por dos vías de señalización independientes. La isoforma CnAβ1 se localiza en el aparato de Golgi desde donde regula la fosforilación de AKT, que inhibe GSK3β y produce así un aumento en los niveles de β-catenina, favoreciendo la diferenciación a mesodermo. Por otro lado, la isoforma CnAβ2 está distribuida de una forma más homogénea por el citoplasma celular y controla la activación de NFAT que regula la diferenciación a mesodermo en células embrionarias.

otras isoformas de CnA son capaces de compensar su deficiencia. Así mismo, también se ha descrito que el uso del inhibidor de CnA ciclosporina A (CsA) aumenta la diferenciación *in vitro* a cardiomiocitos (Jansen Of Lorkeers et al, 2014). No obstante, este efecto podría ser debido a otras actividades de la CsA, dado que su mecanismo de acción se basa en la unión a ciclofilina que produce la inhibición calcineruina (Fantini et al, 2006). En este contexto, nosotros hemos observado que CnA β 1 promueve la diferenciación a mesodermo por la activación de la ruta Akt/GSK3 β / β -catenina. La inhibición de CnA β 2 provocó un defecto similar en la capacidad de las células para diferenciarse a mesodermo, aunque en este caso el efecto fue más suave y no se observaron cambios en la vía de señalización de AKT/GSK3/ β -catenina. Todos estos datos sugieren que las diferentes isoformas de CnA podrían tener efectos redundantes durante la diferenciación de las ESC y el desarrollo embrionario, y que podrían estar activando diferentes vías de señalización para asegurar que el proceso de diferenciación queda completado incluso en ausencia de alguna de ellas (Fig. 37).

Así mismo, y pese a que el ratón deficiente de CnA β 1 no presenta defectos durante el desarrollo embrionario, la pérdida de diversas proteínas del complejo regulador de la actividad de AKT mTORC2, como Rictor, Mlst8 y mSIN1, es letal durante la embriogénesis en ratón (Guertin et al, 2006; Jacinto et al, 2006; Shiota et al, 2006; Yang et al, 2006), aunque la deficiencia de otras proteínas de este complejo como Protor1 o Protor2 no son letales (Pearce et al, 2011). Así mismo, en pez cebra se ha descrito recientemente que el complejo mTORC2 regula el movimiento del mesoendodermo durante la gastrulación, mostrando la importancia de éste complejo durante los primeros estadios del desarrollo (Dumortier & David, 2015). Curiosamente, la falta de otra proteína activadora de Akt: PDK1, también es letal durante el desarrollo, mostrando los embriones un defecto en la formación de los somitos, el prosencéfalo, y los tejidos derivados de la cresta neural, pero no el mesencéfalo o el rombencéfalo (Lawlor et al, 2002). Por otro lado, el complejo mTORC1, que es activado por Akt, es esencial para el desarrollo temprano y los ratones deficientes en Raptor mueren a E6.5 (Guertin et al, 2006). Todos estos resultados demuestran la importancia de la vía de señalización de Akt, y muestran la complejidad de su re-

gulación. Así mismo, la unión de alguno de sus componentes como las proteínas Protor1 y 2 no parece esencial para su función durante el desarrollo, al igual que CnA β 1, lo que sugiere una mayor complejidad de esta vía de señalización.

La expresión de CnA β 1 es independiente de U1 y está regulada por proteínas de unión al RNA

La producción de CnA β 1 se caracteriza por depender del reconocimiento de un sitio de poliadenilación alternativo en la región intrónica que hay entre los exones 12 y 13 del gen CnA β . Pese a los estudios previos demostrando que éste tipo de isoformas pueden ser reguladas por el bloqueo de la unión de U1 (Vorlová et al, 2011), o su abundancia (Berg et al, 2012), también ha sido constatado que algunas de estas isoformas no responden a cambios moderados en la expresión de U1 (Berg et al, 2012). Nuestros datos han demostrado que en el caso de CnA β 1 la regulación de su sitio de poliadenilación alternativo es completamente independiente de la unión de U1 al exón 12 o del complejo U2 al exón 13.

Estos datos podrían tener su explicación en la larga longitud de la región 3'UTR de CnA β 1 (aproximadamente 1 Kb), así como en la evolución de esta región. Como puede apreciarse claramente en el esquema de la base de datos ECRbrowser, las regiones de mayor homología de secuencia corresponden a la región codificante de CnA β 1 y a la región que flanquea el sitio de poliadenilación. Esto, junto a los datos de regulación por U1 obtenidos, sugiere que ambos módulos son completamente independientes el uno del otro y que la producción de CnA β 1 se regula por otro mecanismo.

Otros mecanismos que han sido sugeridos para la regulación de estos procesos están relacionados con la velocidad de transcripción de la RNA polimerasa y con la unión de proteínas específicas. Los datos de expresión en tejidos, así como la fuerte conservación evolutiva de la región de poliadenilación en diferentes especies nos sugirieron que la unión de proteínas específicas podría tener una mayor influencia en este proceso.

Nuestros datos demuestran que la producción de CnA β 1 está regulada principalmente por su región de poliadenilación alternativa, la cual está influenciada por las proteínas de unión al RNA hnRNPF y Mbnl1 en diferentes tipos celulares (Fig. 38). Es importante destacar que, si bien la regulación de CnA β 1 en 293T no solo favorece su inclusión sino también la bajada en los niveles de expresión de CnA β 2, como cabría esperar, este cambio no se observó en las células embrionarias, en las que la expresión de CnA β 1 disminuye al inhibir la expresión de Mbnl1. Esto podría ser debido a que los niveles de expresión de CnA β 1 en mESC son más bajos que los niveles de expresión de CnA β 2, y una pequeña bajada de CnA β 1, como la observada, no tendría por qué generar una subida de la otra isoforma. Otra opción es que Mbnl1 no regula la expresión de CnA β 1, sino su estabilidad en el citoplasma. Sería interesante analizar en el futuro cómo regula Mbnl1 la expresión y/o la estabilidad de CnA β 1 en mESC. No obstante, nuestros resultados son similares a otros previamente publicados donde se ha mostrado que los exones que presentan sitios de unión para Mbnl1 en C2C12 se corresponden con exones regulados por AS durante la diferenciación de las mESC (Han et al, 2013; Wang et al, 2012).

La regulación del splicing o poliadenilación de CnA β 1 ha sido una pregunta de gran interés para el laboratorio teniendo en cuenta que su función en el corazón es opuesta a la de otras isoformas. Es importante tener en cuenta que la selección del exón alternativo de CnA β 1 no sólo depende de la identificación del sitio de poliadenilación, sino de todo el exón como un exón terminal. Los exones se definen por la presencia de una región de unión de U2 al inicio, y U1 al final, excepto en los exones finales donde U1 no puede unirse. Curiosamente, nuestros resultados usando morpholinos sugieren que en el caso de CnA β 1 la unión de U1 no influye en el splicing o poliadenilación alternativos, sino que lo importante es la unión de otros factores de splicing que promueven o inhiben su producción. Durante los últimos años han aparecido algunos estudios que han demostrado la existencia de proteínas de unión al complejo de poliadenilación, que son capaces de regular la producción de algunas isoformas alternativas de manera específica. Sería muy interesante analizar en el

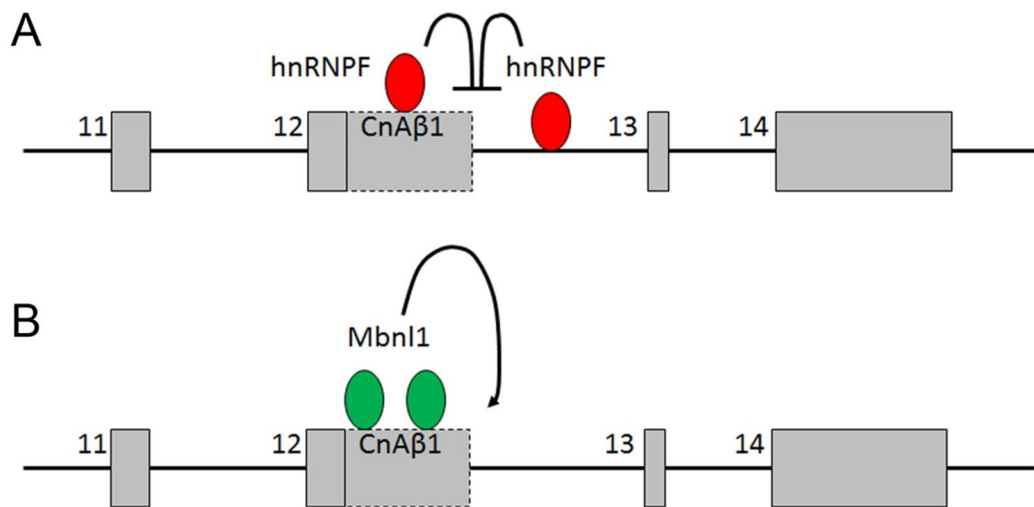


Figura 38: La producción de CnAβ1 está regulada por proteínas de unión a RNA. **A**, En células 293T el factor de splicing hnRNPF regula de forma negativa la producción de CnAβ1, pero no en células embrionarias. **B**, En células embrionarias la producción de CnAβ1 está regulada por la unión de Mbnl1 a su región codificante.

futuro la influencia que estas proteínas pueden tener en la regulación de la expresión de CnAβ1.

Por otro lado, el hecho de que en diferentes tipos celulares la regulación de CnAβ1 sea por proteínas diferentes demuestra la importancia del tipo celular usado para los estudios de AS, especialmente si se quieren utilizar como pruebas de concepto para futuros ensayos terapéuticos. Por ello, sería muy interesante realizar ensayos similares en cardiomiocitos neonatales y en la línea celular HL1 de cardiomiocitos para estudiar su regulación en éstas células.

La isoforma de calcineurina CnAβ1 en el corazón tiene un efecto opuesto al resto de calcineurinas A

Pese a los resultados obtenidos en células embrionarias, la generación de una línea de ratón sin la región C-terminal de CnAβ1 no tiene ningún efecto adverso obvio a los 2 meses de edad. Los ratones CnAβ^{Δ12} son fértiles y nacen siguiendo un patrón mendeliano, lo que descarta problemas graves de desarrollo. Este fenotipo puede deberse a un mecanismo compensatorio a lo largo del

desarrollo por parte de otra isoforma de calcineurina, dado que diversas isoformas parecen implicadas en el proceso de diferenciación celular controlando diferentes vías de señalización, o por parte de otra proteína desconocida para nosotros. Por otro lado, es posible que la señalización de Akt en otros órganos no se vea comprometida y sea suficiente para la viabilidad del desarrollo embrionario.

Estos resultados no son del todo inesperados teniendo en cuenta que los ratones CnA β knockout existen desde hace años (Bueno et al, 2002). Es importante señalar que en esos ratones la región eliminada de DNA se corresponde con el exón 2, cuya secuencia forma parte del dominio catalítico de la enzima y cuya secuencia es múltiplo de 3. Esto significa que, potencialmente, los ratones knockout para CnA β podrían estar expresando CnA β 1 sin dominio catalítico pero con el resto de dominios en principio inalterados (asumiendo que se mantuviera la estructura de la proteína). La caracterización de la presencia de CnA β 1 en estos ratones nunca ha sido llevada a cabo, y sería interesante realizarla en un futuro. Así mismo, en el artículo original en el que se describe el knockout de CnA β no queda indicada la presencia de problemas de desarrollo ni alteraciones en la proporción de nacimientos, lo que sugiere que estos ratones son viables. Curiosamente, los ratones knockout para CnA β presentan resistencia al desarrollo de hipertrofia cardíaca inducida por TAC o por bombas de angiotensina (Bueno et al, 2002). Esta resistencia a la hipertrofia cardíaca viene determinada por su incapacidad para inducir una respuesta correcta de NFAT. Por otro lado, la sobreexpresión de una isoforma constitutivamente activa de calcineurina A en el corazón produce una hipertrofia mal adaptativa favorecida por la inducción de la señalización de NFAT (Molkentin et al, 1998).

En el corazón, la exclusión del intrón que codifica para el dominio C-terminal de CnA β 1 no produce una inducción en los niveles de CnA β 2, seguramente debido a que los niveles de transcripción de CnA β 1 son bajos, especialmente comparados con los de la isoforma mayoritaria (CnA β 2). Así mismo, no se observó una inducción de RCAN1.4 en ratones adultos a dos meses, lo que sugiere que la vía de señalización de CnA β 2/NFAT no se encontraba más activa en estos ratones. Estos datos fueron confirmados por un análisis

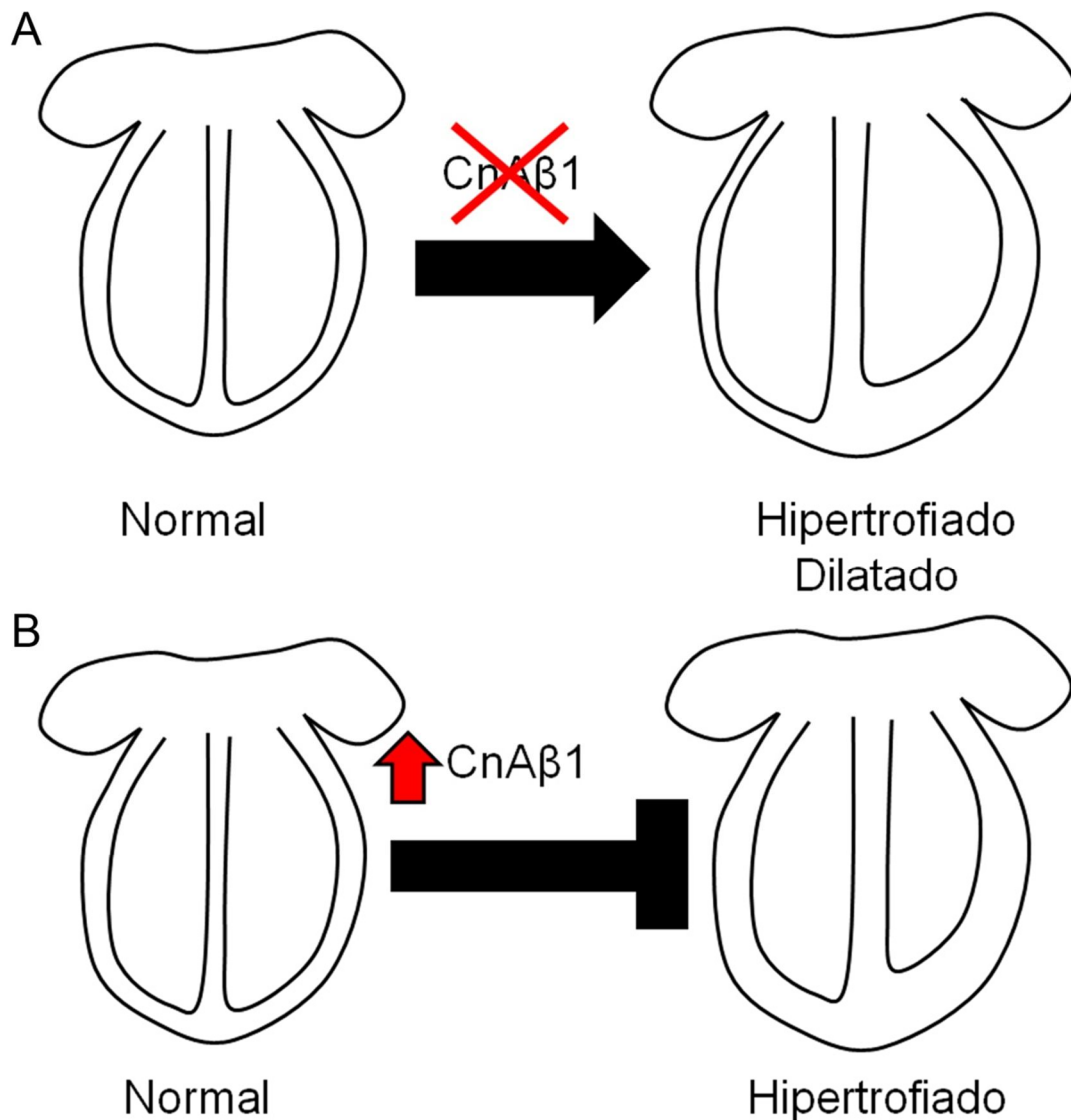


Figura 39: CnAβ1 es necesaria para la correcta función cardíaca. **A**, La eliminación de CnAβ1 promueve el desarrollo de hipertrofia cardíaca y dilatación ventricular a los 15 meses. **B**, La sobreexpresión de CnAβ1 en el corazón inhibe la producción de fibrosis y favorece la función cardíaca en un modelo de hipertrofia cardíaca.

ecocardiográfico a dos meses de edad en el que no se observaron signos de hipertrofia cardíaca.

Curiosamente, aunque la expresión de CnAβ1 no parece necesaria para la función del corazón a dos meses, si lo es durante el envejecimiento. El análisis por ecografía del corazón de los ratones deficientes en CnAβ1 mostró hipertrofia cardíaca y remodelado del ventrículo izquierdo, incluyendo dilatación

ventricular y redondeo del ápex, todo lo cual está asociado a una pérdida de la capacidad contráctil (Fig. 39). La falta de inducción de la producción de colágeno y *Isil* oxidasa, pese a la presencia de los marcadores de insuficiencia e hipertrofia cardíaca BNP y RCAN1.4, sugiere que en el tiempo analizado (15 meses de edad) es posible que la enfermedad aun no hubiese avanzado lo suficiente como para desarrollar fibrosis.

El análisis de la presión aórtica medida en la cola de los animales no mostró ningún cambio entre los animales control y los animales $CnA\beta 1^{\Delta i12-13}$ a 2 ni 15 meses de edad. No obstante, quizás existiese un aumento la presión intraventricular asociado a un fallo en otro órgano o una estenosis aórtica. Es por ello que no puede descartarse que el fenotipo observado en estos ratones no esté originado en el corazón, y esté por el contrario asociado a otro órgano. Con el fin de confirmar o descartar estas alternativas, actualmente se está caracterizando una línea de ratones en la que se han cruzado los ratones $CnA\beta 1^{\Delta i12-13}$ con los $\alpha MHC-CnA\beta 1$. No obstante, sería interesante la generación de un ratón $CnA\beta 1$ knockout específico de tejido mediante la introducción de dos sitios flox flanqueando la región de poliadenilación alternativa. De esta forma, sería posible mantener la expresión de $CnA\beta 1$ en unos niveles normales en otros tejidos y determinar el órgano origen de la hipertrofia cardíaca. Así mismo, estos resultados deben ser validados en un modelo con un fondo genético puro.

La sobreexpresión de $CnA\beta 1$ específicamente en los cardiomiocitos tiene un efecto contrario al observado en la pérdida de función. No obstante, el incremento de $CnA\beta 1$ no repercute en una menor actividad en la señalización de NFAT por una menor disponibilidad de CnB . Nuestros resultados han mostrado que esta mejora se debe, entre otras cosas, a una menor fibrosis cardíaca. Estos resultados, junto a los resultados obtenidos en los modelos de infarto de miocardio (Felkin et al, 2011; López-Olañeta et al, 2014), sugieren que la sobreexpresión de $CnA\beta 1$ en el corazón podría ser una herramienta útil para el tratamiento de las enfermedades cardíacas. En ésta línea, es importante tener en cuenta que los modelos actuales sólo nos permiten conocer qué sucede al aumentar o eliminar la expresión de una de las dos isoformas de $CnA\beta$, $CnA\beta 1$

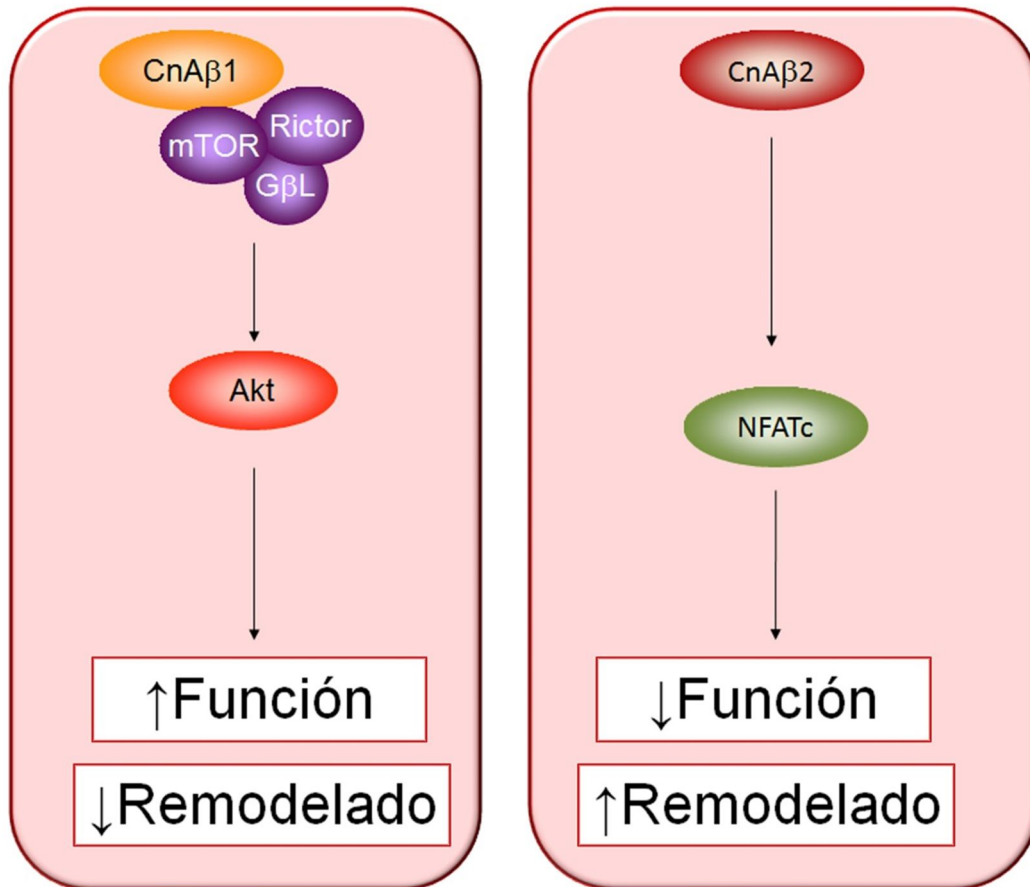


Figura 40. Las isoformas de CnAβ CnAβ1 y CnAβ2 ejercen funciones opuestas en el corazón adulto. La sobreexpresión de CnAβ1 es beneficiosa tras el infarto de miocardio o la inducción de hipertrofia por sobrecarga de presión, promoviendo una menor fibrosis, una mayor vascularización y una mejor función cardíaca. En el corazón infartado, la sobreexpresión de CnAβ1 regula la señalización de Akt y tiene un efecto beneficioso sobre la función y el remodelado del corazón (Felkin et al, 2011; López-Olañeta et al, 2014). Curiosamente, la eliminación genética del dominio catalítico de CnAβ tiene un efecto antihipertrófico por su incapacidad de activar NFAT (Bueno et al, 2002), mientras que la sobreexpresión de una isoforma constitutivamente activa promueve la hipertrofia cardíaca (Molkentin et al, 1998). Todos estos datos sugieren funciones opuestas para ambas isoformas en el corazón.

o CnAβ2, pero no su intercambio. La identificación de un regulador del cambio de una isoforma por otra en CnAβ podría tener grandes implicaciones a nivel translacional, teniendo en cuenta que ambas poseen propiedades opuestas (Fig. 40). Por un lado, la sobreexpresión de CnAβ1 favorece una mejor respuesta del corazón en los modelos de infarto e hipertrofia al inhibir la fibrosis y promover una mejor contracción, mientras que la sobreexpresión de CnAβ2 genera una hipertrofia maladaptativa con alta presencia de fibrosis, impidiendo la correcta contracción del corazón (Fig. 40).

En resumen, nuestros resultados han demostrado que la producción de CnA β 1 está regulada de forma específica por diferentes proteínas de unión al RNA y cómo la región C-terminal generada posee un dominio de localización en el aparato de Golgi. La expresión de CnA β 1 en células embrionarias es necesaria para la diferenciación a mesodermo mediante la activación de la vía de AKT/GSK3 β / β -catenina. Los ratones deficientes de CnA β 1 son viables, pero desarrollan hipertrofia cardíaca con la edad. Opuestamente, la sobreexpresión de CnA β 1 en el corazón adulto favorece su recuperación tras el infarto de miocardio, o la constricción de la aorta al disminuir la fibrosis cardíaca y promover una mejor contracción del corazón.

6

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. CnA β 1 regula la diferenciación a mesodermo de células embrionarias de ratón mediante la activación de la ruta de señalización de Akt/GSK3 β / β -catenina.
2. CnA β 1 posee dos α -hélices en su región C-terminal, de las cuales la segunda interacciona con la proteína Cog8 y localiza CnA β 1 en el aparato de Golgi.
3. La localización de CnA β 1 en el aparato de Golgi es necesaria, al menos en parte, para la activación de Akt por CnA β 1.
4. La expresión de CnA β 1 es independiente de la unión de U1 en la región 5' del exón y está regulada por la unión de los factores de splicing hnRNPF y Mbnl1 a su región codificante y su región 3' no codificante en células 293T y células embrionarias respectivamente.
5. La falta de CnA β 1 no es esencial para el desarrollo embrionario y postnatal de los ratones, pero promueve la aparición de hipertrofia cardiaca con la edad.
6. La sobreexpresión de CnA β 1 en el corazón adulto reduce la hipertrofia ventricular en un contexto de sobrecarga de presión, disminuye la fibrosis y mejora la función cardiaca.

7

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

Berg M, Singh L, Younis I, Liu Q, Pinto A, Kaida D, Zhang Z, Cho S, Sherrill-Mix S, Wan L, Dreyfuss G (2012) U1 snRNP determines mRNA length and regulates isoform expression. *Cell* **150**: 53-64

Betz C, Hall M (2013) Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol* **203**: 563-574

Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C, Frieden M, Demaurex N, Hall M (2013) mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 12526-12534

Bond A, Ming G, Song H (2015) Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* **17**: 385-395

Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, Semeraro C, Iacovino M, Kyb aM, Blanpain C (2008) Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* **3**: 69-84

Boulbés D, Shaiken T, Sarbassov dos D (2011) Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2. *Biochem Biophys Res Commun* **413**: 46-52

Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U (2009) Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *Int J Mol Sci* **10**: 2763-2788

Bueno O, Wilkins B, Tymitz K, Glascock B, Kimball T, Lorenz J, Molkentin J (2002) Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4586-4591

Canals I, Soriano J, Orlandi J, Torrent R, Richaud-Patin Y, Jiménez-Delgado S, Merlin S, Follenzi A, Consiglio A, Vilageliu L, Grinberg D, Raya A (2015) Activity and High-Order Effective Connectivity Alterations in Sanfilippo C Patient-Specific Neuronal Networks. *Stem Cell Reports* **5**: 546-557

Canellada A, Ramirez B, Minami T, Redondo J, Cano E (2008) Calcium/calcineurin signaling in primary cortical astrocyte cultures: Rcan1-4 and cyclooxygenase-2 as NFAT target genes. *Glia* **56**: 709-722

Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza S, Ang Y, Schaniel C, Lee D, Yang L, Kaplan A, Adler E, Rozov R, Ge Y, Cohen N, Edelmann L, Chang B, Waghray A, Su J, Pardo

Bibliografia

S, Lichtenbelt K, Tartaglia M, Gelb B, Lemischka I (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* **465**: 808-812

Crowley S, Gurley S, Herrera M, Ruiz P, Griffiths R, Kumar A, Kim H, Smithies O, Le T, Coffman T (2006) Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17985-17990

Cho A, Tang Y, Davila J, Deng S, Chen L, Miller E, Wernig M, Graef I (2014) Calcineurin signaling regulates neural induction through antagonizing the BMP pathway. *Neuron* **82**: 109-124

Chong J, Yang X, Don C, Minami E, Liu Y, Weyers J, Mahoney W, Van Biber B, Cook S, Palpant N, Gantz J, Fugate J, Muskheli V, Gough G, Vogel K, Astley C, Hotchkiss C, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill E, Nelson V, Kiem H, Laflamme M, Murry C (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* **510**: 273-277

Chung S, Andersson T, Sonntag K, Björklund L, Isacson O, Kim K (2002) Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **20**: 139-145

D Guerini, Klee CB (1989) Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9183-9187

de la Pompa J, Timmerman L, Takimoto H, Yoshida H, Elia A, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille B, Crabtree G, Mak T (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* **392**: 182-186

Dippold H, Ng M, Farber-Katz S, Lee S, Kerr M, Peterman M, Sim R, Wiharto P, Galbraith K, Madhavarapu S, Fuchs G, Meerloo T, Farquhar M, Zhou H, Field S (2009) GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* **139**: 337-351

Djebali S, Davis C, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov G, Khatun J, Williams B, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid R, Alioto T, Antoshechkin I, Baer M, Bar N, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood M, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo O, Park E, Persaud K, Preall J, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See L, Shahab A, Skancke J, Suzuki A, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang H, Wrobel

J, Yu Y, Ruan X, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis S, Hannon G, Giddings M, Ruan Y, Wold B, Carninci P, Guigó R, Gingeras T (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**: 101-108

Dubois N, Craft A, Sharma P, Elliott D, Stanley E, Elefanty A, Gramolini A, Keller G (2011) SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **29**: 1011-1018

Dumortier J, David N (2015) The TORC2 component, Sin1, controls migration of anterior mesendoderm during zebrafish gastrulation. *PLoS One* **10**

Elkon R, Ugalde A, Agami R (2013) Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* **14**: 496-506

Esteban V, Méndez-Barbero N, Jiménez-Borreguero L, Roqué M, Novensá L, García-Redondo A, Salaices M, Vila L, Arbonés M, Campanero M, Redondo J (2011) Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *J Exp Med* **208**: 2125-2139

Fantini M, Becker C, Kiesslich R, Neurath M (2006) Drug insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**: 633-644

Felkin L, Narita T, Germack R, Shintani Y, Takahashi K, Sarathchandra P, López-Olañeta M, Gómez-Salinerio J, Suzuki K, Barton P, Rosenthal N, Lara-Pezzi E (2011) Calcineurin splicing variant calcineurin A β 1 improves cardiac function after myocardial infarction without inducing hypertrophy. *Circulation* **123**: 2838-2847

Frias M, Thoreen C, Jaffe J, Schroder W, Sculley T, Carr S, Sabatini D (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* **16**: 1865-1870

Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, Slobodeniuc V, O'Hanlon D, Sung H, Alvarez M, Talukder S, Pan Q, Mazzoni E, Nedelec S, Wichterle H, Woltjen K, Hughes T, Zandstra P, Nagy A, Wrana J, Blencowe B (2011) An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* **147**: 132-146

Galan-Caridad J, Harel S, Arenzana T, Hou Z, Doetsch F, Mirny L, Reizis B (2007) Zfx controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells. *Cell* **129**: 345-357

Guertin D, Stevens D, Thoreen C, Burds A, Kalaany N, Moffat J, Brown M, Fitzgerald K, Sabatini D (2006) Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or

Bibliografia

mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell* **11**: 859-871

Hackett J, Surani M (2014) Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell* **15**: 416-430

Han H, Irimia M, Ross P, Sung H, Alipanahi B, David L, Golipour A, Gabut M, Michael I, Nachman E, Wang E, Trcka D, Thompson T, O'Hanlon D, Slobodeniuc V, Barbosa-Morais N, Burge C, Moffat J, Frey B, Nagy A, Ellis J, Wrana J, Blencowe B (2013) MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature* **498**: 241-245

Hogan P, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *17* **18**

Huelga S, Vu A, Arnold J, Liang T, Liu P, Yan B, Donohue J, Shiue L, Hoon S, Brenner S, Ares MJ, Yeo G (2012) Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Rep* **1**: 167-178

Hunt S, Abraham W, Chin M, Feldman A, Francis G, Ganiats T, Jessup M, Konstam M, Mancini D, Michl K, Oates J, Rahko P, Silver M, Stevenson L, Yancy C (2009) 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* **119**: 391-479

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung S, Huang Q, Qin J, Su B (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**: 125-137

Jan C, Williams C, Weissman J (2014) Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* **346**

Jansen Of Lorkeers S, Hart E, Tang X, Chamuleau M, Doevendans P, Bolli R, Chamuleau S (2014) Cyclosporin in cell therapy for cardiac regeneration. *J Cardiovasc Transl Res* **7**: 475-482

Jessup M, Brozena S (2003) Heart failure. *N Engl J Med* **348**: 2007-2018

JH W, ZC Z, RM W, J S (2015) GM130 Regulates Golgi-Derived Spindle Assembly by Activating TPX2 and Capturing Microtubules. *Cell* **162**: 287-299

Jiang F, Yang J, Zhang Y, Dong M, Wang S, Zhang Q, Liu F, Zhang K, Zhang C (2014) Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol* **11**: 413-426

Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M (2014) Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* **2**: 205-218

Kamiya D, Banno S, Sasai N, Ohgushi M, Inomata H, Watanabe K, Kawada M, Yakura R, Kiyonari H, Nakao K, Jakt L, Nishikawa S, Sasai Y (2011) Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors. *Nature* **470**: 503-509

Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D (2005) Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* **23**: 165-175

Kattman S, Witty A, Gagliardi M, Dubois N, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G (2011) Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* **8**: 228-240

Ke H, Huai Q (2003) Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun* **311**: 1095-1102

Ko B, Chang T, Shyue S, Chen Y, Liou J (2009) An efficient transfection method for mouse embryonic stem cells. *Gene Ther* **16**: 154-158

Lara-Pezzi E, Gómez-Salineró J, Gatto A, García-Pavía P (2013) The alternative heart: impact of alternative splicing in heart disease. *J Cardiovasc Transl Res* **6**: 945-955

Lara-Pezzi E, Menasché P, Trouvin J, Badimón L, Ioannidis J, Wu J, Hill J, Koch W, De Felice A, de Waele P, Steenwinckel V, Hajjar R, Zeiher A (2015) Guidelines for translational research in heart failure. *J Cardiovasc Transl Res* **8**: 3-22

Lara-Pezzi E, Winn N, Paul A, McCullagh K, Slominsky E, Santini M, Mourkioti F, Sarathchandra P, Fukushima S, Suzuki K, Rosenthal N (2007) A naturally occurring calcineurin variant inhibits FoxO activity and enhances skeletal muscle regeneration. *J Cell Biol* **179**: 1205-1218

Lawlor M, Mora A, Ashby P, Williams M, Murray-Tait V, Malone L, Prescott A, Lucocq J, Alessi D (2002) Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J* **21**: 3728-3738

Bibliografia

Lee D, Su J, Kim H, Chang B, Papatsenko D, Zhao R, Yuan Y, Gingold J, Xia W, Darr H, Mirzayans R, Hung M, Schaniel C, Lemischka I (2015) Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. *Cell* **161**: 240-254

Li H, Rao A, PG H (2011) Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* **21**: 91-103

Li X, Zhu L, Yang A, Lin J, Tang F, Jin S, Wei Z, Li J, Y J (2011) Calcineurin-NFAT signaling critically regulates early lineage specification in mouse embryonic stem cells and embryos. *Cell Stem Cell* **8**: 46-58

Lindsley R, Gill J, Kyba M, Murphy T, Murphy K (2006) Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development* **133**: 3787-3796

Liu L, Luo Y, Chen L, Shen T, Xu B, Chen W, Zhou H, Han X, Huang S (2010) Rapamycin inhibits cytoskeleton reorganization and cell motility by suppressing RhoA expression and activity. *J Biol Chem* **285**: 38362-38373

López-Olañeta M, Villalba M, Gómez-Salineró J, Jiménez-Borreguero L, Breckenridge R, Ortiz-Sánchez P, García-Pavía P, Ibáñez B, Lara-Pezzi E (2014) Induction of the calcineurin variant CnAβ1 after myocardial infarction reduces post-infarction ventricular remodelling by promoting infarct vascularization. *Cardiovasc Res* **102**: 396-406

Lu X, Göke J, Sachs F, Jacques P, Liang H, Feng B, Bourque G, Bubulya P, Ng H (2013) SON connects the splicing-regulatory network with pluripotency in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **15**: 1141-1152

Lu Y, Loh Y, Li H, Cesana M, Ficarro S, Parikh J, Salomonis N, Toh C, Andreadis S, Luckey C, Collins J, Daley G, Marto J (2014) Alternative splicing of MBD2 supports self-renewal in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **15**: 92-101

Lyon R, Zanella F, Omens J, Sheikh F (2015) Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* **116**: 1462-1476

Martin-Puig S, Wang Z, Chien K (2008) Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* **2**: 320-331

Matsui T, Li L, Wu J, Cook S, Nagoshi T, Picard M, Liao R, Rosenzweig A (2002) Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J Biol Chem* **277**: 22896-22901

Medyouf H, Ghysdael J (2008) The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle* **7**: 297-303

Millarte V, Farhan H (2012) The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis. *ScientificWorldJournal* **2012**: 498278

Miller P, Folkmann A, Maia A, Efimova N, Efimov A, Kaverina I (2009) Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol* **11**: 1069-1080

Miyabayashi T, Teo J, Yamamoto M, McMillan M, Nguyen C, Kahn M (2007) Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5668-5673

Molkentin J, Lu J, Antos C, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant S, Olson E (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**: 215-228

Mozaffarian D, Benjamin E, Go A, Arnett D, Blaha M, Cushman M, de Ferranti S, Després J, Fullerton H, Howard V, Huffman M, Judd S, Kissela B, Lackland D, Lichtman J, Lisabeth L, Liu S, Mackey R, Matchar D, McGuire D, Mohler Er, Moy C, Muntner P, Mussolino M, Nasir K, Neumar R, Nichol G, Palaniappan L, Pandey D, Reeves M, Rodriguez C, Sorlie P, Stein J, Towfighi A, Turan T, Virani S, Willey J, Woo D, Yeh R, Turner M, Subcommittee. AHASCaSS (2015) Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **131**: 29-322

Naito A, Akazawa H, Takano H, Minamino T, Nagai T, Aburatani H, Komuro I (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ Res* **97**: 144-151

Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K (2009) A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **460**: 118-122

Oh W, Wu C, Kim S, Facchinetti V, Julien L, Finlan M, Roux P, Su B, Jacinto E (2010) mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J* **29**: 3939-3951

Pan Q, Shai O, Lee L, Frey B, Blencowe B (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* **40**: 1413-1415

Bibliografia

Pankaj K Mandal, Rossi DJ (2013) Reprogramming human fibroblast to pluripotency using modified mRNA. *Nature Protocols* **8**: 568-582

Patten R, Hall-Porter M (2009) Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail* **2**: 138-144

Pearce L, Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wulschleger S, Deak M, Ibrahim A, Gourlay R, Magnuson M, Alessi D (2007) Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* **405**: 513-522

Pearce L, Sommer E, Sakamoto K, Wulschleger S, Alessi D (2011) Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem J* **436**: 169-179

Ranger A, Grusby M, Hodge M, Gravalles E, de la Brousse F, Hoey T, Mickanin C, Baldwin H, Glimcher L (1998) The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**: 186-190

Rayon T, Menchero S, Nieto A, Xenopoulos P, Crespo M, Cockburn K, Cañon S, Sasaki H, Hadjantonakis A, de la Pompa J, Rossant J, Manzanares M (2014) Notch and hippo converge on Cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. *Dev Cell* **30**: 410-422

Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios R (2009) Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* **28**: 1016-1028

Rodriguez J, Maietta P, Ezkurdia I, Pietrelli A, Wesselink J, Lopez G, Valencia A, Tress M (2013) APPRIS: annotation of principal and alternative splice isoforms. *Nucl Acids Res* **41**: 110-111

Rumi-Masante J, Rusinga F, Lester T, Dunlap T, Williams T, Dunker A, Weis D, Creamer T (2012) Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. *J Mol Biol* **415**: 307-317

Sarbassov D, Ali S, Kim D, Guertin D, Latek R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini D (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**: 1296-1302

Scott K, Kabbarah O, Liang M, Ivanova E, Anagnostou V, Wu J, Dhakal S, Wu M, Chen S, Feinberg T, Huang J, Saci A, Widlund H, Fisher D, Xiao Y, Rimm D,

Protopopov A, Wong K, Chin L (2009) GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature* **459**: 1085-1090

Schenck A, Goto-Silva L, Collinet C, Rhinn M, Giner A, Habermann B, Brand M, Zerial M (2008) The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell* **133**: 486-497

Schroder W, Buck M, Cloonan N, Hancock J, Suhrbier A, Sculley T, Bushell G (2007) Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell Signal* **19**: 1279-1289

Schroder W, Cloonan N, Bushell G, Sculley T (2004) Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene. *Gene* **339**: 17-23

Shiota C, Woo J, Lindner J, Shelton K, Magnuson M (2006) Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell* **11**: 583-589

SM E, D Y, FL C, ML K (2010) Myocardial lineage development. *Circ Res* **107**: 1428-1444

Sung L, Gao S, Shen H, Yu H, Song Y, Smith S, Chang C, Inoue K, Kuo L, Lian J, Li A, Tian X, Tuck D, Weissman S, Yang X, Cheng T (2006) Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Genet* **38**: 1323-1328

Sütterlin C, Colanzi A (2010) The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *J Cell Biol* **188**: 621-628

Sutton M, Sharpe N (2000) Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction *Circulation* **101**: 2981-2988

Tabar V, Studer L (2014) Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nat Rev Genet* **15**: 82-92

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-872

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676

Bibliografia

Thomas J, Zhang Y, Wei Y, Cho J, Morris L, Wang H, Zheng X (2014) Rab1A is an mTORC1 activator and a colorectal oncogene. *Cancer Cell* **26**: 754-769

Tilgner H, Knowles D, Johnson R, Davis C, Chakraborty S, Djebali S, Curado J, Snyder M, Gingeras T, Guigó R (2012) Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Res* **22**: 1616-1625

Tonge P, Corso A, Monetti C, Hussein S, Puri M, Michael I, Li M, Lee D, Mar J, Cloonan N, Wood D, Gauthier M, Korn O, Clancy J, Preiss T, Grimmond S, Shin J, Seo J, Wells C, Rogers I, Nagy A (2014) Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature* **516**: 192-197

Tress M, Martelli P, Frankish A, Reeves G, Wesselink J, Yeats C, Olason P, Albrecht M, Hegyi H, Giorgetti A, Raimondo D, Lagarde J, Laskowski R, López G, Sadowski M, Watson J, Fariselli P, Rossi I, Nagy A, Kai W, Størling Z, Orsini M, Assenov Y, Blankenburg H, Huthmacher C, Ramírez F, Schlicker A, Denoeud F, Jones P, Kerrien S, Orchard S, Antonarakis S, Reymond A, Birney E, Brunak S, Casadio R, Guigo R, Harrow J, Hermjakob H, Jones D, Lengauer T, Orengo C, Patthy L, Thornton J, Tramontano A, Valencia A (2007) The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5495-5500

Vorlová S, Rocco G, Lefave C, Jodelka F, Hess K, Hastings M, Henke E, Cartegni L (2011) Induction of antagonistic soluble decoy receptor tyrosine kinases by intronic polyA activation. *Mol Cell* **43**: 927-939

Wang E, Cody N, Jog S, Biancoletta M, Wang T, Treacy D, Luo S, Schroth G, Housman D, Reddy S, Lécuyer E, Burge C (2012) Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **150**: 710-724

Warren L, Manos P, Ahfeldt T, Loh Y, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal P, Smith Z, Meissner A, Daley G, Brack A, Collins J, Cowan C, Schläeger T, Rossi D (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**: 618-630

Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T (2006) Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25**: 2697-2707

Wilkins B, Dai Y, Bueno O, Parsons S, Xu J, Plank D, Jones F, Kimball T, Molkenstein J (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* **94**: 110-118

Willett R, Kudlyk T, Pokrovskaya I, Schönherr R, Ungar D, Duden R, Lupashin V (2013) COG complexes form spatial landmarks for distinct SNARE complexes. *Nat Commun* **4**

Wu J, Okamura D, Li M, Suzuki K, Luo C, Ma L, He Y, Li Z, Benner C, Tamura I, Krause M, Nery J, Du T, Zhang Z, Hishida T, Takahashi Y, Aizawa E, Kim N, Lajara J, Guillen P, Campistol J, Esteban C, Ross P, Saghatelian A, Ren B, Ecker J, Izpisua Belmonte J (2015) An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* **521**: 316-321

Xiangyu L, X F Steven Z (2007) Endoplasmic Reticulum and Golgi Localization Sequences for Mammalian Target of Rapamycin. *Mol Biol Cell* **18**: 1073-1082

Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan K (2006) Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* **20**: 2820-2832

Yang X, Pabon L, Murry C (2014) Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* **114**: 511-523

Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane J, Tian S, Nie J, Jonsdottir G, Ruotti V, Stewart R, Slukvin I, Thomson J (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917-1920

Yuan Y, Pan B, Sun H, Chen G, Su B, Huang Y (2015) Characterization of Sin1 Isoforms Reveals an mTOR-Dependent and Independent Function of Sin1 γ . *PLoS One* **10**

Zangi L, Lui K, von Gise A, Ma Q, Ebina W, Ptaszek L, Später D, Xu H, Tabebordbar M, Gorbato R, Sena B, Nahrendorf M, Briscoe D, Li R, Wagers A, Rossi D, Pu W, Chien K (2013) Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol* **31**: 898-907

Zhao T, Zhang Z, Rong Z, Xu Y (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**: 212-215

Zhao T, Zhang Z, Westenskow P, Todorova D, Hu Z, Lin T, Rong Z, Kim J, He J, Wang M, Clegg D, Yang Y, Zhang K, Friedlander M, Xu Y (2015) Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**: 353-359

8

MATERIAL SUPLEMENTARIO: TABLAS

MATERIAL SUPLEMENTARIO: TABLAS

Tabla Suplementaria 1. Expresión de genes en mESCs 48 horas después de la transfección de los siRNA de CnAβ1 en condiciones pluripotentes.

Se aisló el RNA de las células embrionarias que habían sido transfectadas con los RNA de interferencia y se analizó la expresión de sus genes por microarray. Los valores de la tabla muestran una inducción lineal en comparación con los valores del siRNA control. El signo negativo indica inhibición. Los genes mostrados son aquellos con un cambio >1.4.

Affymetrix ID	Inducción CnAβ1 (1) vs Control	Inducción CnAβ1 (2) vs Control	Nombre del gen
10408593	1.51	1.45	Serpinb6c
10423570	1.82	1.47	
10450930	1.40	1.43	Crisp1
10557853	1.42	1.51	B230325K18Rik
10584315	1.49	1.44	
10604154	-1.48	-1.49	Rhox9

Tabla suplementaria 2. Expresión diferencial de genes en cuerpos embrionarios tras la inhibición de CnA β 1. Las mESC se transfectaron con un RNA de interferencia control y dos contra CnA β 1. La expresión de los genes se analizó a las 48 horas por microarray. Los valores muestran una inducción lineal al compararlos con el control. El signo negativo indica inhibición. Los genes con un valor de diferencia mayor a 2.0 se muestran en la tabla.

Affymetrix ID	Inducción CnA β 1 (1) vs Control	Inducción CnA β 1 (2) vs Control	Nombre del gen
A_52_P382149	-1.10	-2.45	Cyp26a1
A_55_P2040951	-3.01	-3.06	Actc1
A_51_P371051	-1.09	-2.30	Glpr1
A_55_P2399878	-1.47	-2.17	4930402F11Rik
A_51_P404193	-1.35	-2.54	Sp5
A_51_P124254	-1.51	-2.31	Col4a1
A_55_P1957198	-1.08	-2.17	Apob
A_55_P2134236	-1.26	-2.90	Foxa2
A_55_P2029161	-1.40	-2.01	T
A_55_P2032272	-1.35	-2.42	Habp2
A_51_P476018	-1.22	-2.24	Sox7
A_51_P343350	-1.13	-2.01	Amn
A_51_P411917	-1.31	-2.32	Gata6
A_52_P447284	-1.00	-2.13	Clic6
A_55_P2152547	-2.95	-2.64	Myl3
A_52_P473966	-1.28	-2.02	Kdelr3
A_55_P2102449	-1.22	-2.31	Nxf7
A_55_P2108109	-1.67	-2.70	Fgf8
A_52_P51078	-1.01	-3.07	Ctsh
A_55_P2111163	-1.45	-3.92	S100g
A_55_P2013236	-1.40	-3.92	S100g

A_55_P2157023	-1.34	-2.05	Sox17
A_55_P1983448	-2.23	-1.33	S100a4
A_52_P300451	-1.41	-2.10	Tcf23
A_55_P2047639	-1.34	-2.37	Cubn
A_55_P2184434	-1.39	-2.09	Eomes
A_51_P491350	-1.61	-2.37	Col4a2
A_55_P2046877	-1.10	-2.02	Foxq1
A_55_P2318584	-1.19	-2.62	Aqp8
A_55_P2026405	-1.25	-2.05	Foxb1
A_55_P1979833	-1.25	-2.05	Cited1
A_51_P370717	-1.30	-2.31	Gsc
A_55_P2101508	-1.76	-2.56	Fgf8
A_55_P2071349	-1.49	-2.09	Trh
A_55_P2047638	-1.32	-2.31	Cubn
A_66_P114804	2.17	1.42	Gm7325
A_55_P2123502	2.38	1.33	Jam2
A_55_P1977943	1.69	2.26	Insm1
A_55_P2010066	2.18	1.57	Capn3
A_55_P2111563	2.04	1.72	
A_52_P367760	2.07	1.84	Calml4

Tabla Suplementaria 3. Análisis de la ontología genética (Gene Ontology – GO) en los cuerpos embrionarios tras la inhibición de CnAβ1. Análisis de la ontología genética de los genes inhibidos a las 48 horas del tratamiento con los RNA de interferencia de CnAβ1. Tan solo se muestran las listas con un $p \leq 0.05$.

Gene Ontology	Nº Genes	P-valor
chordate embryonic development	7	9.20E-05
embryonic development ending in birth or egg hatching	7	9.70E-05
muscle organ development	4	4.00E-03
regulation of transcription	11	4.20E-03
blood vessel morphogenesis	4	5.50E-03
dorsal/ventral pattern formation	3	6.10E-03
regionalization	4	6.90E-03
tissue morphogenesis	4	9.20E-03
embryonic organ development	4	9.50E-03
blood vessel development	4	9.80E-03
vasculature development	4	1.00E-02
in utero embryonic development	4	1.30E-02
lipoprotein transport	2	1.30E-02
pattern specification process	4	1.50E-02
lung development	3	1.80E-02
respiratory tube development	3	1.80E-02
respiratory system development	3	2.20E-02
embryonic morphogenesis	4	2.70E-02
dorsal/ventral neural tube patterning	2	2.90E-02
transcription	8	3.60E-02
forebrain development	3	3.70E-02
positive regulation of cell differentiation	3	4.10E-02
neural tube patterning	2	4.30E-02

regulation of transcription, DNA-dependent	7	4.60E-02
negative regulation of Wnt receptor signalling pathway	2	4.70E-02
regulation of RNA metabolic process	7	4.90E-02
cardiac muscle cell differentiation	2	5.00E-02

Tabla Suplementaria 4. Análisis de doble híbrido. Se muestran los clones con potencial interacción con CnAβ1.

Gen	Código Proteína	Nombre
Npm1	NM_012992	Rattus norvegicus nucleophosmin 1 (Npm1), mRNA
Ldhb	NM_012595	Rattus norvegicus lactate dehydrogenase B (Ldhb), mRNA
Flna	XM_238167	PREDICTED: Rattus norvegicus filamin, alpha
Sep15	NM_133297	Rattus norvegicus selenoprotein (Sep15), mRNA
Sep15	NM_133297	Rattus norvegicus selenoprotein (Sep15), mRNA
MT-Cyb	AB033713	Rattus norvegicus mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds
Pgk1	BC063161	Rattus norvegicus phosphoglycerate kinase 1, mRNA
Tax1bp1	NM_001004199	Rattus norvegicus Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1 (Tax1bp1), mRNA
Sorbs1	XM_001154712	PREDICTED: Pan troglodytes sorbin and SH3 domain containing 1, transcript variant 10 (SORBS1), mRNA
Sorbs1	XM_001154933	PREDICTED: Pan troglodytes sorbin and SH3 domain containing 1, transcript variant 14 (SORBS1), mRNA
Sorbs1	XM_001155148	PREDICTED: Pan troglodytes sorbin and SH3 domain containing 1, transcript variant 18 (SORBS1), mRNA
Cap	AJ489942	Homo sapiens mRNA for c-Cbl associated protein (CAP gene).
Nedd4	NM_012986	Rattus norvegicus neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4 (Nedd4), mRNA
Mdh1	NM_033235	Rattus norvegicus malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) (Mdh1), mRNA
Cbx3	NM_001008313	Rattus norvegicus chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila) (Cbx3), mRNA
Tpd52	XR_031313	Mus musculus similar to Tpd52 protein (LOC100045143), misc RNA
Tfg	NM_001012144	Rattus norvegicus Trk-fused gene (Tfg), mRNA
Cog8	NM_001106182	Rattus norvegicus component of oligomeric golgi complex 8 (predicted) (Cog8_predicted), mRNA
Gapdh	NM_017008	Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA
Ptgis	NM_031557	Rattus norvegicus prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (Ptgis), mRNA.
Smpd1	NM_001006997	Rattus norvegicus sphingomyelin phosphodiesterase 1,

		acid lysosomal (Smpd1), mRNA
Tnfrsf1a	BC086413	Rattus norvegicus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a, mRNA (cDNA clone MGC:105478 IMAGE:7110094), complete cds
Col1a1	NM_053304	Rattus norvegicus procollagen, type 1, alpha 1 (Col1a1), mRNA
App	XM_001075993	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Amyloid beta (A4) precursor-like protein 1 (predicted), transcript variant 1(RGD1561211_predicted), mRNA.
Dhdds	NM_001011978	Rattus norvegicus dehydrodolichyl diphosphate synthase (Dhdds), mRNA
Gpnmb	NM_133298	Rattus norvegicus glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb), mRNA
Anxa5	AF051895	Rattus norvegicus lipocortin V mRNA, partial cds
Anxa5	NM_013132	Rattus norvegicus annexin A5 (Anxa5), mRNA
Emilin1	NM_001106710	Rattus norvegicus elastin microfibril interfacer 1 (predicted) (Emilin1_predicted), mRNA
Rpsa	NM_017138	Rattus norvegicus ribosomal protein SA (Rpsa), mRNA
Rasd1	XM_340809	PREDICTED: Rattus norvegicus RAS, dexamethasone-induced 1 (Rasd1), mRNA
Rtn3	NM_001009953	Rattus norvegicus reticulon 3 (Rtn3), transcript variant 2, mRNA
Mdh2	NM_031151	Rattus norvegicus malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial) (Mdh2), mRNA
Myl6	BC126064	Rattus norvegicus myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow, mRNA (cDNA clone MGC:156486 IMAGE:7190683), complete cds
Rpl3	NM_198753	Rattus norvegicus ribosomal protein L3 (Rpl3), mRNA
Ppp3r1/CnB	NM_017309	Rattus norvegicus protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I) (Ppp3r1), mRNA
Galnt2	NM_139272	Mus musculus UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 2 (Galnt2), mRNA
Arhgef6	NM_152801	Mus musculus Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6 (Arhgef6), mRNA
Gpx7	NM_001106673	Rattus norvegicus glutathione peroxidase 7 (predicted) (Gpx7_predicted), mRNA
Suclg2	XM_001074572	PREDICTED: Rattus norvegicus succinate-Coenzyme A ligase, GDP-forming, beta subunit, transcript variant 4

Material Suplementario: Tablas

		(Suc1g2), mRNA
Sdc4	M81786	Rattus norvegicus ryudocan mRNA, complete cds
Sdc4	NM_012649	Rattus norvegicus syndecan 4 (Sdc4), mRNA
Aco2	NM_024398	Rattus norvegicus aconitase 2, mitochondrial (Aco2), mRNA
Cd59	NM_012925	Rattus norvegicus CD59 antigen (Cd59), mRNA
Mrpl45	NM_001105834	Rattus norvegicus mitochondrial ribosomal protein L45 (predicted) (Mrpl45_predicted), mRNA
Rbms2	NM_031643	Rattus norvegicus mitogen activated protein kinase kinase 1 (Map2k1), mRNA
Rbms2	NM_001025403	Rattus norvegicus RNA binding motif, single stranded interacting protein 2 (Rbms2), mRNA
Htt	U18650	Rattus norvegicus Huntington gene product mRNA, complete cds
Tubb	NM_001109119	Rattus norvegicus similar to tubulin, beta 2 (LOC498736), mRNA
Mgat4b	BC031613	Mus musculus mannoside acetylglucosaminyltransferase 4, isoenzyme B, mRNA (cDNA clone MGC:36850 IMAGE:4216720), complete cds
Col5a1	NM_134452	Rattus norvegicus procollagen, type V, alpha 1 (Col5a1), mRNA
Bnip3	NM_053420	Rattus norvegicus BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (Bnip3), mRNA
Hspa8	NM_024351	Rattus norvegicus heat shock protein 8 (Hspa8), mRNA
Uqcrc1	NM_001004250	Rattus norvegicus ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 (Uqcrc1), mRNA
Decr1	NM_057197	Rattus norvegicus 2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial (Decr1), mRNA
Whsc2	NM_001008339	Rattus norvegicus Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 (human) (Whsc2), mRNA
Whsc2	BC061534	Rattus norvegicus clusterin, mRNA (cDNA clone MGC:72717 IMAGE:6886725), complete cds
Trpm2	M64723	Rat TRPM-2 mRNA, complete cds
Sgp2	X13231	Rat mRNA for sulfated glycoprotein 2
Cd81	NM_013087	Rattus norvegicus CD 81 antigen (Cd81), mRNA
Rab7	NM_023950	Rattus norvegicus RAB7, member RAS oncogene family (Rab7), mRNA
Tcf4	NM_053369	Rattus norvegicus transcription factor 4 (Tcf4), mRNA

Tabla Suplementaria 5. Datos ecocardiográficos de los ratones Control y CnA $\beta^{\Delta i12}$ a 2, 8 y 15 meses. Los ratones se analizaron a distintos tiempos por ecografía y se muestran los parámetros más relevantes del estudio. Los datos representan la media \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Control vs CnA $\beta^{\Delta i12}$; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 comparados con los ratones a 2 meses. ANOVA de dos vías.

		2 Meses				8 Meses				15 Meses			
		Control		CnA $\beta^{\Delta i12}$		Control		CnA $\beta^{\Delta i12}$		Control		CnA $\beta^{\Delta i12}$	
Eje corto	Medida	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
	Pared Anterior en diástole (mm)	0.81	0.10	0.81	0.16	0.90	0.13	0.88	0.19	0.93	0.12	1.06 ###	0.11
	Pared Anterior en sístole (mm)	1.22	0.15	1.16	0.15	1.30	0.15	1.27	0.36	1.27	0.13	1.44 ##	0.17
	Diámetro Interno del Ventrículo Izquierdo en diástole (mm)	3.85	0.43	3.94	0.26	3.95	0.23	3.94	1.01	4.14	0.26	4.41	0.37
	Diámetro Interno del Ventrículo Izquierdo en sístole (mm)	2.69	0.45	2.74	0.32	2.79	0.28	2.70	0.80	2.97	0.32	3.26 #	0.56
	Pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (mm)	0.84	0.21	0.76	0.10	0.92	0.17	0.84	0.16	0.84	0.15	0.96 * ##	0.11
	Pared posterior del ventrículo izquierdo en sístole (mm)	1.08	0.17	1.07	0.13	1.20	0.16	1.12	0.29	1.17	0.13	1.25 #	0.12
	Fracción de eyección (%)	57.94	9.24	54.70	15.07	56.80	6.44	58.59	9.53	55.17	6.21	51.21	12.89
	Masa cardíaca del ventrículo izquierdo (mg)	115.55	25.79	106.70	30.59	137.36	21.18	140.73	28.64	142.66	15.31	192.07 *** ###	32.72
	Masa cardíaca corregida del ventrículo izquierdo (mg)	92.44	20.64	85.33	24.56	109.89	16.95	112.58 ##	22.91	114.13	12.24	153.65 ** ###	26.17
	Área del ventrículo izquierdo en diástole (mm)	13.59	2.06	14.33	1.80	14.69	1.51	14.63	2.40	14.67	1.54	16.35 #	1.88
	Área del ventrículo izquierdo en sístole (mm)	7.76	2.05	7.75	1.47	7.67	1.62	7.88	2.22	8.31	1.19	9.84 #	1.94
	Fracción de acortamiento (mm)	43.40	8.99	46.22	5.89	48.04	8.27	46.74	9.18	43.55	2.32	40.00	8.71

		2 Meses				8 Meses				15 Meses			
		Control		CnAβ Δi12		Control		CnAβ Δi12		Control		CnAβ Δi12	
		Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
Eje largo	Volumen del ventrículo izquierdo en diástole (μl)	65.88	19.36	66.46	11.13	70.87	9.69	76.22	20.10	78.47	11.08	95.81 * ###	12.13
	Volumen del ventrículo izquierdo en sístole (μl)	34.75	11.87	27.25	7.50	27.85	6.32	31.15	13.11	35.51	7.24	53.09 ** ###	15.63
	Fracción de eyección (%)	54.08	7.02	59.39	6.95	60.98	5.90	60.81	8.45	54.90	5.96	45.47 ** ###	11.18

Tabla Suplementaria 6. Datos ecocardiográficos de los ratones Control y α MHC-CnA β 1 tras la ligadura de la aorta. Se indujo un incremento de presión ventricular por la ligadura de la aorta en ratones control (WT) y ratones transgénicos α MHC-CnA β 1, y se analizaron por ecografía 21 días después de la operación. Los datos están comparados con una situación control donde se abrió y cerro al animal, pero no se realizó ningún otro procedimiento (Sham). Se muestran los parámetros más relevantes del estudio. Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$ TAC vs Sham; † $p < 0.05$ transgenico vs WT; ANOVA de dos vías. LV Mass corr, masa corregida; LVPWd, pared posterior del ventrículo en diástole; IVSd, septo interventricular en diástole; LVESV, volumen ventrículo izquierdo en sístole; LVEDV, volumen ventrículo izquierdo en diástole; EF, fracción de eyección.

Echocardiography	Sham		TAC	
	WT	α MHC-CnA β 1	WT	α MHC-CnA β 1
LV Mass corr. (mg)	87.9 \pm 4.9	93.1 \pm 4.0	163.7 \pm 11.4*	124.6 \pm 4.9*†
LVPWd (mm)	0.79 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03	1.17 \pm 0.04*	0.98 \pm 0.04*†
IVSd (mm)	0.82 \pm 0.03	0.83 \pm 0.03	1.09 \pm 0.03*	0.96 \pm 0.03*†
LVESV (μ l)	32.93 \pm 3.57	30.12 \pm 1.59	51.81 \pm 5.84*	35.92 \pm 2.80†
LVEDV (μ l)	67.13 \pm 4.05	62.95 \pm 2.63	83.62 \pm 5.65*	69.66 \pm 3.51†
% EF	52.36 \pm 2.78	52.28 \pm 1.45	39.70 \pm 3.61*	48.71 \pm 2.71†

9

MATERIAL SUPLEMENTARIO: PUBLICACIONES

MATERIAL SUPLEMENTARIO: PUBLICACIONES

La versión completa de los artículos se encuentra en el CD adjuntado con ésta Tesis Doctoral.

Actualmente se encuentra en preparación el siguiente manuscrito:

Gómez-Salineró JM, López-Olañeta MM, Ortiz-Sánchez P, Larrasa-Alonso JJ, Gatto A, García-Pavía P, Sundararaman B, Giovino G, Yeo GW, Lara-Pezzi E. "The calcineurin variant CnA β 1 regulates mesoderm specification in embryonic stem cells through β -catenin." *Submitted* (2015).

Durante esta Tesis Doctoral se ha contribuido a las siguientes publicaciones:

Buyandelger B, Mansfield C, Kostin S, Choi O, Roberts AM, Ware JS, Mazzarotto F, Pesce F, Buchan R, Isaacson RL, Vouffo J, Gunkel S, Knöll G, McSweeney SJ, Wei H, Perrot A, Pfeiffer C, Toliat MR, Ilieva K, Krysztofinska E, López-Olañeta MM, **Gómez-Salineró JM**, Schmidt A, Ng KE, Teucher N, Chen J, Teichmann M, Eilers M, Haverkamp W, Regitz-Zagrosek V, Hasenfuss G, Braun T, Pennell DJ, Gould I, Barton PJ, Lara-Pezzi E, Schafer S, Hübner N, Felkin LE, O'Regan DP, Petretto E, Brand T, Milting H, Nürnberg P, Schneider MD, Prasad S, Knöll R. "ZBTB17 (MIZ1) Is Important for the Cardiac Stress Response and a Novel Candidate Gene for Cardiomyopathy and Heart Failure." *Circ Cardiovasc Genet*. 2015 Jul 14. pii: CIRCGENETICS.113.000690. [Epub ahead of print]

López-Olañeta MM, Villalba M., **Gómez-Salineró JM**, Jiménez-Borreguero LJ, Breckenridge R, Ortiz Sánchez P, García-Pavía P., Ibáñez B, Lara-Pezzi E. "Induction of the calcineurin variant CnA β 1 after myocardial infarction reduces post-infarction ventricular remodeling by promoting infarct vascularization." *Cardiovascular Research*. 2014; 102(3):396-406.

Lara-Pezzi E, **Gómez-Salineró J**, Gatto A, García-Pavía P. J. "The alternative heart: Impact of alternative splicing in heart disease." *Cardiovasc Transl Res*. 2013; 6(6):945-55. (*Review*)

Panase KD, Felkin LE, López-Olañeta MM, **Gómez-Salineró J**, Villalba M, Muñoz L, Nakamura K, Shimano M, Walsh K, Barton PJ, Rosenthal N, Lara-Pezzi E. "Follistatin-like3 mediates paracrine fibroblast activation by cardiomyocytes." *J Cardiovasc Transl Res*. 2012; 5(6):814-26.

Felkin LE, Narita T, Germack R, Shintani Y, Takahashi K, Sarathchandra P, López-Olañeta MM, **Gómez-Salineró JM**, Suzuki K, Barton PJ, Rosenthal N, Lara-Pezzi E. "Calcineurin splicing variant calcineurin A β 1 improves cardiac function after myocardial infarction without inducing hypertrophy." *Circulation*. 2011; 123(24):2838-47.

El splicing alternativo desempeña un papel muy importante durante la diferenciación de las células progenitoras embrionarias (ESC). Nuestros resultados muestran como Mbnl1 regula el splicing del mRNA de calcineurina A beta (CnA β) en ESC de ratón, resultando en la expresión de la variante atípica CnA β 1 que posee un dominio C-terminal único. La inhibición de CnA β 1 provoca la inactivación de la señalización de Akt/GSK3 β / β -catenina, lo que su vez se traduce en un defecto en la especificación a mesodermo. Hemos identificado un dominio específico en la segunda α -hélice de la región C-terminal que regula la activación de la vía de Akt/GSK3 β / β -catenina. Tras realizar un ensayo de doble híbrido en levadura, encontramos que CnA β 1 interacciona con Cog8 en el aparato de Golgi. La inhibición de Cog8 deslocaliza CnA β 1 e interfiere con la diferenciación a mesodermo de las ESC. En resumen, hemos determinado las bases estructurales para el mecanismo de acción de CnA β 1 y su función en la diferenciación de las ESC al linaje de mesodermo. Con el fin de caracterizar mejor la función de CnA β 1 *in vivo*, eliminamos la región C-terminal única de CnA β 1 por la eliminación del intrón 12-13, que llamamos CnA β Δ i12. Los ratones provenientes de esta construcción nacen de manera normal y no presentan ningún defecto a 2 meses de edad, pero con el tiempo desarrollan una hipertrofia cardíaca a los 15 meses. Curiosamente, la sobreexpresión de CnA β 1 en los cardiomiocitos, bajo el promotor de α -MHC, es capaz de disminuir los efectos de la hipertrofia cardíaca en un modelo de sobrecarga por presión. Estos resultados son opuestos a los descritos anteriormente para otras isoformas de calcineurina y sugieren su potencial uso para terapias.

